



SKRIPSI

**PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK, FLAVONOID
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
PROPOLIS *Trigona* sp.**

RHIBY AINUR BASIT HARIYANTO
NRP : 1412 100 088

Dosen Pembimbing 1
Drs. Agus Wahyudi, M.S.

Dosen Pembimbing 2
Zjahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.

DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017



SCRIPT

**DETERMINATION OF PHENOLIC, FLAVONOID
CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
Trigona sp.'s PROPOLIS EXTRACTS.**

**RHIBY AINUR BASIT HARIYANTO
NRP : 1412 100 088**

**Advisor I
Drs. Agus Wahyudi, M.S.**

**Advisor II
Zjhra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF MATHEMATICS AND SCIENCE
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2017**

**PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK, FLAVONOID
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
PROPOLIS *Trigona* sp.**

SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

Disusun Oleh:

RHIBY AINUR BASIT HARIYANTO
NRP 1412 100 088

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN
PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK, FLAVONOID
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
PROPOLIS *Trigona* sp.

SKRIPSI

Disusun oleh:

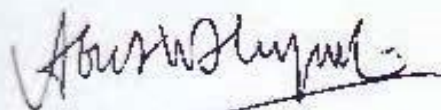
RHIBY AINUR BASIL HARIYANTO
NRP 1412 100 088

Surabaya, 10 Juli 2017


Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



Drs. Agus Wahyudi, M.S.
NIP. 19600815 198803 1 004



Ziahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.
NIP. 19000901 201504 2 001

Mengetahui,

Kepala Departemen Kimia



Prof. Dr. Didik Prasetyoko, S.Si, M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK, FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK PROPOLIS *Trigona* sp.

Nama : Rhiby Ainur Basit Hariyanto
NRP : 1412 100 088
Departemen : Kimia FMIPA - ITS
Dosen Pembimbing I : Drs. Agus Wahyudi, M.S.
Dosen Pembimbing II : Zjahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.

Abstrak

Propolis merupakan hasil produksi dari lebah madu yang telah diketahui mempunyai banyak aktivitas biologis seperti antibakteri, antiinflamasi, antikanker dan antioksidan. *Trigona* sp., merupakan salah satu spesies lebah tak bersengat yang dapat menghasilkan propolis dengan kualitas baik. Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis pelarut yang paling efektif diantara metanol, etanol 70%, dan etil asetat dalam mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid yang terdapat dalam propolis, serta untuk mengetahui nilai kandungan fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan dari ekstrak propolis. Berdasarkan hasil analisa kandungan fenolik, dan flavonoid diketahui bahwa pelarut yang paling efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid dalam propolis adalah pelarut metanol. Hasil analisa kandungan fenolik total diperoleh nilai kandungan fenolik dalam ekstrak propolis metanol (EPMe) sebesar $498,925 \pm 6,322 \mu\text{g Asam Galat Ekivalen (AGE)/g}$ sarang lebah kering, ekstrak propolis etil asetat (EPEA) sebesar $140,302 \pm 9,541 \mu\text{g (AGE)/g}$ sarang lebah kering, ekstrak propolis etanol 70% (EPeT) sebesar $104,628 \pm 0,583 \mu\text{g (AGE)/g}$ sarang lebah kering. Hasil analisa kandungan flavonoid total diperoleh kandungan flavonoid pada EPMe sebesar $129,265 \pm 2,166 \text{ Kuersetin Ekivalen (KE)/g}$ sarang lebah kering, EPEA sebesar $12,088 \pm 0,553 \mu\text{g (KE)/g}$ sarang lebah kering, EPeT sebesar $0,405 \pm 0,064 \mu\text{g (KE)/g}$ sarang lebah kering. Nilai aktivitas antioksidan disajikan dalam bentuk persentase (%) dekolorasi. Nilai aktivitas antioksidan dari ketiga ekstrak propolis adalah $90,697 \pm 0,673\%$ (EPMe), $90,354 \pm 0,657\%$ (EPEA) dan $88,782 \pm 0,098\%$ (EPeT).

Kata kunci: *Propolis, fenolik, flavonoid, aktivitas antioksidan*

DETERMINATION OF PHENOLIC, FLAVONOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Trigona* sp.'s PROPOLIS EXTRACTS.

Nama : Rhiby Ainur Basit Hariyanto
NRP : 1412 100 088
Department : Kimia FMIPA - ITS
Supervisor I : Drs. Agus Wahyudi, M.S.
Supervisor II : Zjahra Vianita Nugraheni, S.Si, M.Si.

Abstract

Propolis is honeybees product which has been known has many biological activities, such as antibactery, antiinflammation, anticancer, and antioxidant. *Trigona* sp., one of stingless honeybees species that produce well qualities propolis. The aim of this research are to know the best solvent between methanol, ethanol 70% and ethyl acetate to extract phenolic and flavonoid compounds and to know the value of phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of propolis extracts. Based on results from total phenolic and flavonoid content assays, the best solvent to extract phenolic and flavonoid content of propolis is methanol. The results of total phenolic content assay from methanolic extract propolis (MEP) was $498,925 \pm 6,322$ μg Gallic Acid Equivalent (GAE) /g dry beehives, ethyl acetate extract propolis (EAEP) was $140,302 \pm 9,541$ μg (GAE)/g dry beehives and ethanolic extract propolis (EEP) was $104,628 \pm 0,583$ μg GAE) /g dry beehives. The results of total flavonoid content from MEP was $129,265 \pm 2,166$ Quercetin Equivalent (QE)/g dry beehives, EAEP was $12,088 \pm 0,553$ μg (QE)/g dry beehives and EEP was $0,405 \pm 0,064$ μg (QE)/g dry beehives. Antioxidant activity of propolis was represented by percent of decoloration (% decoloration). Percent of decoloration of MEP was $90,697 \pm 0,673\%$, EAEP was $90,354 \pm 0,657\%$ and EEP was $88,782 \pm 0,098\%$.

Keywords: *propolis, phenolic, flavonoid, antioxidant activity*

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Puji dan syukur penulis sampaikan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya, sehingga naskah skripsi yang berjudul **“PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK, FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK PROPOLIS *Trigona* sp.”** dapat terselesaikan. Ucapan terimakasih tak lupa penulis sampaikan kepada:

1. Drs. Agus Wahyudi, M.S., Zjhra Vianita Nugraheni, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing pertama dan kedua yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, dan ilmunya kepada penulis dari awal proses penelitian, hingga proses penyusunan naskah skripsi.
2. Dr. Ir. Endah Mutiara Marhaeni Putri, M.Si., selaku Dosen Wali yang telah membimbing dan memberikan arahan dalam hal akademik maupun non akademik penulis selama menempuh studi di Departemen Kimia FMIPA ITS.
3. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Kimia ITS atas fasilitas yang diberikan selama proses penelitian.
4. Dr. Yulfi Zetra, M.S., selaku Kepala Laboratorium Geokimia Molekuler, yang telah memberikan izin penggunaan laboratorium.
5. Keluarga Besar Laboratorium Geokimia Organik, yang telah memberikan bantuan baik berupa do'a, motivasi, dan juga ilmunya sejak awal penelitian, hingga proses penyusunan naskah skripsi.
6. Dosen dan Staf Jurusan Kimia FMIPA ITS.

7. Keluarga besar saya, terutama Mama saya yang telah memberikan dukungan, semangat, dan do'a yang luar biasa untuk saya.
8. Sahabat-sahabat saya yang telah memberikan dukungan serta doa bagi saya.
9. Semua pihak yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak mungkin saya sebutkan seluruhnya.

Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis, pembaca, maupun mahasiswa-mahasiswa yang ingin melanjutkan penelitian lebih lanjut tentang propolis *Trigona* sp.

Surabaya, 10 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| KATA PENGANTAR..... | vii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR TABEL..... | xi |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Permasalahan..... | 4 |
| 1.3 Tujuan | 4 |
| 1.4 Manfaat | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Propolis | 5 |
| 2.1.1 Komposisi Propolis | 7 |
| 2.1.2 Ekstraksi Propolis | 11 |
| 2.1.3 Aktivitas Antioksidan Propolis..... | 13 |
| 2.2 Uji Antioksidan Metode DPPH | 16 |
| 2.3 Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis) | 17 |
| BAB III METODOLOGI PENELITIAN | 21 |
| 3.1 Alat..... | 21 |
| 3.2 Bahan | 21 |
| 3.3 Prosedur | 21 |
| 3.3.1 Ekstraksi Propolis | 21 |
| 3.3.2 Penentuan Kandungan Polifenolik Total | 22 |
| 3.3.3 Penentuan Kandungan Total Flavonoid..... | 22 |
| 3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH..... | 23 |
| BAB IV PEMBAHASAN | 25 |
| 4.1 Ekstraksi Propolis..... | 25 |
| 4.2 Kandungan Fenolik Total | 27 |
| 4.3 Kandungan Flavonoid Total | 29 |
| 4.4 Aktivitas Antioksidan Propolis..... | 31 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 35 |
| 5.1 Kesimpulan | 35 |
| 5.2 Saran | 36 |
| DAFTAR PUSTAKA | 37 |
| LAMPIRAN..... | 47 |
| BIODATA PENULIS | 73 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Propolis dari Sarang Lebah <i>Trigona</i> sp. | 6 |
| Gambar 2.2 | Mekanisme Reaksi Kuersetin dengan DPPH | 16 |
| Gambar 2.3 | Jenis-Jenis Transisi Elektron..... | 18 |
| Gambar 2.4 | Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis..... | 19 |
| Gambar 4.1 | Sarang Lebah <i>Trigona</i> sp. | 25 |
| Gambar 4.2 | Ekstrak Propolis dengan Pelarut: (A) Etanol 70% (B) Metanol (C) Etil Asetat | 27 |
| Gambar 4.3 | Pengaruh Kandungan Fenolik terhadap Aktivitas Antioksidan | 32 |
| Gambar 4.4 | Grafik Pengaruh Kandungan Flavonoid terhadap Aktivitas Antioksidan..... | 33 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Kandungan Total Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Propoli dari Berbagai Daerah di Indonesia | 9 |
| Tabel 2.2 Penelitian Kandungan Fenolik Propolis dari Berbagai Negara..... | 10 |
| Tabel 2.3 Penelitian Kandungan Flavonoid Propolis dari Berbagai Negara..... | 11 |
| Tabel 2.4 Penelitian Aktivitas Antioksidan Propolis di Indonesia | 15 |
| Tabel 4.1 Hasil Ekstraksi Propolis | 26 |
| Tabel 4.2 Kandungan Fenolik Total | 28 |
| Tabel 4.3 Kandungan Flavonoid Ekstrak Propolis | 30 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kekayaan alam Indonesia, tidak hanya terdapat pada jenis floranya saja, tetapi Indonesia juga kaya akan berbagai jenis fauna, salah satunya adalah lebah madu. Salah satu spesies lebah madu yang banyak terdapat di Indonesia adalah spesies *Trigona* sp., atau yang lebih dikenal dengan sebutan lebah klanceng. Spesies lebah ini banyak ditemukan di daerah neotropis seperti, Meksiko, Argentina, India, Sri Lanka, Taiwan, Pulau Solomon, Indonesia bagian selatan, Pulau Guinea dan Australia (Michener, 2000).

Hasil produksi madu yang sangat sedikit menyebabkan spesies lebah *Trigona* sp. kurang banyak dieksplorasi di Indonesia, apabila dibandingkan dengan spesies lebah *Apis* sp. (Yuliana dkk., 2013). Spesies lebah ini hanya dapat menghasilkan madu kurang lebih satu kilogram setiap tahunnya, sementara lebah madu *Apis* sp., dapat menghasilkan rata-rata 75 kg madu per tahun (Djajasaputra, 2010). Meskipun spesies *Trigona* sp. menghasilkan madu yang sangat sedikit, namun spesies lebah ini dapat menghasilkan propolis yang lebih banyak daripada spesies lebah madu lainnya. Spesies lebah ini mampu memproduksi propolis hingga tiga kilogram per tahun. Sementara itu, spesies lebah *Apis* sp., hanya menghasilkan propolis berkisar dua gram per tahun (Singh, 1962; Siregar dkk., 2011).

Propolis merupakan campuran antara zat aktif yang disekresikan dan dieksudasi oleh tanaman, seperti getah, damar dan sebagainya, dengan air liur dan lilin lebah (Crane, 1988; Susilo dkk., 2009). Propolis mempunyai komposisi senyawa kimia yang sangat bervariasi. Hal tersebut dikarenakan variasi spesies lebah, dan juga kondisi geografis dari sumber tanaman yang digunakan oleh para koloni lebah untuk membuat propolis (Selvan dan Prabhu, 2010). Propolis mentah secara umum mengandung 50% resin, 30% lilin, 10% minyak esensial, 5% pollen dan 5% senyawa-senyawa organik lainnya (Siregar dkk., 2011). Sebanyak 241 senyawa, yang terdiri dari senyawa-senyawa flavonoid, fenolik, terpenoid, gula, hidrokarbon dan mineral, telah teridentifikasi

dalam kurun waktu 12 tahun yakni dari tahun 2000-2012 (Huang dkk., 2014).

Keanekaragaman senyawa bioaktif yang terdapat dalam propolis, menyebabkan propolis mempunyai beberapa aktivitas biologis. Beberapa aktivitas biologis dari propolis adalah aktivitas antibakteri, antikanker, anti-inflamasi, antiviral, antifungal dan antioksidan (Banskota dkk., 2001; Nagaoka dkk., 2003; Siregar dkk., 2011). Penelitian terhadap aktivitas biologis propolis dari Indonesia relatif jarang dilakukan. Beberapa aktivitas biologis dari propolis Indonesia yang pernah diteliti adalah antibakteri (Fatoni dkk., 2008; Nugraheni, 2013; Sabir, 2005; Suseno, 2009; Susilo dkk., 2009; Tukan, 2008), antiinflamasi (Prasetyo dan Suparyanti, 2013), antikanker (Hasan dkk., 2013), antiplasmodial (Syamsudin dkk., 2008). Penelitian tentang aktivitas antioksidan propolis dari Indonesia juga pernah dilakukan oleh Hasan dkk. (2014), yang menggunakan sampel propolis *Trigona* sp. dari daerah Pandeglang, Kendal, Banjarmasin, Makassar dan Pekanbaru. Penelitian yang dilakukan oleh Novilla dkk. (2014), mengungkapkan aktivitas antioksidan dari propolis *Apis mellifera*. Sementara Nugraheni dkk (2016), membandingkan aktivitas antioksidan dari propolis *Apis mellifera* impor dan lokal yang diambil dari daerah Lawang, Jawa Timur. Penelitian terhadap aktivitas antioksidan propolis *Trigona* sp. dari daerah Lawang, Jawa Timur masih belum pernah dilakukan.

Aktivitas antioksidan dari suatu propolis bergantung pada komposisi senyawa-senyawa penyusunnya. Senyawa yang memberikan efek antioksidan pada propolis adalah senyawa-senyawa golongan polifenol, terutama senyawa golongan flavonoid (Sarastrani dkk., 2002). Senyawa-senyawa flavonoid merupakan antioksidan yang baik, dan terbukti lebih baik daripada vitamin C, E dan karotenoid (Dai dan Mumper, 2010). Beberapa senyawa golongan flavonoid yang mempunyai aktivitas antioksidan yang baik adalah kuersetin, kaempferol, morin, mirisitin dan rutin (Rice-Evans dkk., 1996).

Pemilihan jenis pelarut dalam proses ekstraksi, dapat mempengaruhi kandungan flavonoid dan senyawa fenolik lain

yang berhasil terekstrak dari propolis. Standarisasi pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dalam propolis sangat sulit dilakukan. Hal tersebut dikarenakan keberagaman struktur senyawa-senyawa fenolik dalam propolis, yang akan mempengaruhi kelarutan senyawa-senyawa fenolik tersebut dalam pelarut yang digunakan (Iloki-Assanga dkk., 2015).

Pujirahayu dkk. (2014), menjelaskan bahwa kandungan flavonoid dari ekstrak propolis propilen glikol sebesar $0,55 \pm 0,01$ μg KE/mg propolis, lebih tinggi dari kandungan flavonoid dalam ekstrak propolis etanol, propilen glikol, akuades, minyak zaitun dan minyak kelapa murni. Pemilihan jenis pelarut dalam proses ekstraksi, juga dapat mempengaruhi kandungan senyawa polifenol lainnya yang berhasil terekstrak dari propolis, sebagaimana hasil penelitian dari Talla dkk. (2014). Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa kandungan polifenolik total dari ekstrak propolis dengan pelarut air lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut heksana, etil asetat, etanol dan metanol. Kandungan total fenolik ekstrak propolis air sebesar $8,64 \pm 0,47$ g AGE/100g propolis.

Dalam penelitian ini digunakan tiga jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu etanol 70%, metanol dan etil asetat dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi untuk mengekstrak propolis dari sarang lebah *Trigona* sp. yang didapatkan dari Desa Kalirejo, Kecamatan Lawang, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Selanjutnya, ketiga ekstrak propolis tersebut, dibandingkan nilai kandungan total flavonoid dan fenolik. Selain itu, diukur nilai aktivitas antioksidan dari tiap ekstrak propolis, untuk mengetahui pengaruh pemilihan jenis pelarut serta kandungan total flavonoid dan fenolik, terhadap aktivitas antioksidan dari propolis.

1.2 Permasalahan

Berdasarkan penjelasan yang telah disampaikan dalam latar belakang, maka rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah jenis pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid dari propolis?
2. Berapa kandungan total fenolik dan flavonoid dari ekstrak propolis metanol, etanol dan etil asetat?
3. Berapa nilai aktivitas antioksidan dari ekstrak propolis metanol, etanol dan etil asetat?

1.3 Tujuan

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui jenis pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa-senyawa bioaktif dari propolis.
2. Untuk mengetahui total senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak propolis.
3. Untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan dari ekstrak propolis

1.4 Manfaat

Manfaat dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi bagi masyarakat, mengenai potensi propolis dari sarang lebah *Trigona* sp. dari Desa Kalirejo, Kecamatan Lawang, Kabupaten Malang, Jawa Timur., sebagai alternatif antioksidan alami.
2. Memberikan alternatif cara mengolah sarang lebah *Trigona* sp., yang sederhana bagi para peternak lebah di daerah Lawang, Jawa timur, sehingga diharapkan mereka tidak hanya memanfaatkan madu dari sarang lebah *Trigona* sp saja, melainkan propolis yang terkandung di dalamnya juga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.
3. Memberikan peluang untuk pengembangan budidaya propolis di Indonesia, sehingga dapat memberikan nilai tambah bagi perekonomian Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Propolis

Propolis (lem lebah) merupakan zat berwarna cokelat dan lengket, yang diproduksi oleh lebah dari resin atau getah tanaman, yang bercampur dengan enzim dan saliva lebah. Propolis digunakan oleh koloni lebah untuk melindungi sarangnya dari berbagai ancaman, baik berupa ancaman lingkungan maupun serangan dari organisme lainnya (Bankova dkk., 2000; Salatino dkk., 2011; Siregar dkk., 2011; Susilo dkk., 2009).

Propolis mempunyai berbagai macam fungsi unik bagi koloni lebah. Propolis dapat digunakan untuk menutup celah kecil pada sarang lebah, yang berukuran sekitar 6,35 mm (Simone-Finstrom dan Spivak, 2010). Propolis dapat memperkuat stabilitas struktural sarang lebah, dan mengurangi getaran yang berasal dari luar sarang. Propolis juga bersifat desinfektan atau antibakteri, sehingga mampu melindungi sarang lebah dari serangan kuman (bakteri) dari luar sarang. Hal ini dibuktikan dengan ditemukannya bangkai tikus yang tidak berbau dalam sarang lebah. Bangkai tikus tersebut dibungkus oleh propolis dalam sarang lebah, sehingga tidak menimbulkan bau (Siregar dkk., 2011).

Propolis mempunyai warna yang sangat bervariasi. Kebanyakan propolis berwarna cokelat, baik cokelat terang maupun cokelat gelap. Selain itu propolis juga ada yang berwarna hijau, merah, kuning, hitam, bahkan putih. Propolis dapat berbentuk padatan maupun cairan, bergantung pada suhu penyimpanannya. Propolis akan berbentuk padatan yang keras dan rapuh, jika disimpan pada suhu dibawah 15 °C. Jika propolis disimpan pada suhu 25-45°C, maka propolis akan menjadi lengket dan lunak. Pada suhu diantara 45-60 °C, propolis menjadi semakin lengket dan *gummy* (seperti karet), Jika suhu dinaikkan hingga mencapai 60-70°C, maka propolis akan menjadi meleleh dan berubah menjadi fasa cair (Suranto, 2007; Siregar dkk., 2011).

Salah satu spesies lebah yang memproduksi banyak propolis adalah spesies lebah madu tanpa sengat *Trigona* sp. Spesies

Trigona sp. atau klanceng banyak ditemukan hidup di daerah tropis dan sub tropis, seperti Australia, Afrika, Asia Tenggara serta sebagian Meksiko dan Brazil (Free, 1982). *Trigona* sp., diklasifikasikan dalam divisi animalia, filum *Arthropoda*, kelas *Insecta*, ordo *Hymenoptera*, famili *Apidae*, genus *Trigona* dan spesies *Trigona* sp. (Sihombing, 1997). Lebah *Trigona* sp. dapat memproduksi propolis hingga tiga kilogram per tahun. Jumlah ini jauh lebih besar daripada produksi propolis dari spesies lebah *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* yakni kurang lebih dua gram per tahun (Siregar dkk., 2011). Gambar 2.1 merupakan contoh propolis yang terdapat pada sarang lebah *Trigona* sp.



Gambar 2.1 Propolis dari Sarang Lebah *Trigona* sp.

Propolis banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, diantaranya sebagai zat antibakteri, antifungal, antiinflamasi, antiviral, antiparasit, dan juga antioksidan (Sforcin dan Bankova, 2011). Propolis juga mempunyai manfaat untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi, serta dapat digunakan sebagai obat untuk mengobati penyakit maag (Castaldo dan Capasso, 2002). Siregar dkk. (2011), juga menuliskan dalam bukunya bahwa propolis juga telah digunakan untuk mengobati penyakit arteriosklerosis, tumor, kencing manis, radang sendi, reumatik, gangguan pernafasan, gangguan jantung dan pembuluh darah, kanker, gangguan hati dan ginjal.

Menurut Siregar dkk. (2011), sebenarnya propolis telah banyak digunakan oleh manusia sejak zaman dahulu. Pada zaman aristoteles (322-384 SM) , propolis dimanfaatkan sebagai perekat pada plester untuk menutupi luka. Propolis juga dimanfaatkan untuk mengatasi bengkak, gangguan pencernaan dan hati. Bangsa Inca yang telah mendiami daerah Cuzco, Peru sejak tahun 1200 M, memanfaatkan propolis untuk mengobati pembengkakan dan peradangan. Pada tahun 1888-1902 atau lebih tepatnya pada saat terjadi Perang Boer di Afrika Selatan, propolis dicampurkan dengan minyak jeli untuk mencegah terjadinya infeksi pada luka. Sementara itu di Rusia, propolis vanogen yang merupakan campuran antara propolis dan vaselin digunakan sebagai salep untuk mengobati luka akibat perang dunia kedua.

2.1.1 Komposisi Propolis

Propolis mempunyai komposisi senyawa kimia yang sangat bervariasi. Hal tersebut dikarenakan, perbedaan kondisi geografis dari sumber tanaman yang digunakan oleh para koloni lebah untuk membuat propolis (Selvan dan Prabhu, 2010). Untuk membuat propolis, lebah menggunakan zat aktif yang disekresikan dan dieksudasi oleh tanaman, seperti getah, damar dan sebagainya (Crane, 1988). Getah tersebut selanjutnya akan dicampur dengan air liur dan lilin lebah, sehingga dihasilkan zat kental yang berwarna cokelat yang dikenal dengan propolis (lem lebah) (Susilo dkk., 2009). Beberapa jenis tanaman yang merupakan sumber bahan baku pembuat propolis adalah damar (*Agathis spp.*), nangka (*Artocarpus spp.*), kenari (*Canarium spp.*), pala (*Myristica spp.*) dan sawo (*Manilkara zapota*) (Siregar dkk., 2011).

Propolis mentah secara umum mengandung 50% resin, 30% lilin, 10% minyak esensial, 5% pollen dan 5% mineral dan senyawa-senyawa organik lainnya (Siregar dkk., 2011). Menurut Righi dkk. (2013), komposisi senyawa kimia dari propolis yang telah berhasil diidentifikasi diantaranya adalah senyawa-senyawa asam fenolik, asam amino, flavonoid, kalkon, lignan, triterpen, steroid, dan gula. Sementara itu, menurut (Marcucci, 1995), propolis juga mengandung vitamin B1, B2, B6, C, dan E, serta

beberapa mineral seperti seng, tembaga, kalsium, perak, aluminium, sesium, silikon, lantanum dan mercuri.

Aktivitas biologis dari propolis, seperti antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi bergantung pada komposisi senyawa penyusunnya, seperti senyawa-senyawa polifenol dan flavonoid (Nugraheni dkk., 2016). Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa dari senyawa polifenolik, yang biasa digunakan untuk menentukan kualitas dari suatu propolis. Senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid merupakan antioksidan yang baik, dan terbukti lebih baik daripada vitamin C, E dan karotenoid (Dai dan Mumper, 2010). Beberapa senyawa golongan flavonoid yang mempunyai aktifitas antioksidan yang baik adalah kuersetin, kaempferol, morin, mirisitin dan rutin (Rice-Evans dkk., 1996). Hossain dkk. (2011), mengungkapkan bahwa tingginya aktivitas antioksidan dari suatu sampel menunjukkan banyaknya kandungan senyawa polifenol dalam sampel tersebut. Salah satu senyawa fenolik yang mempunyai efek antioksidan yang sangat baik adalah CAPE (*Caffeic Acid Phenetyl Ester*) (Siregar dkk., 2011). Kandungan senyawa flavonoid yang terdapat dalam propolis bergantung pada sumber dari tanaman yang digunakan oleh para koloni lebah untuk membuat sarang mereka (Kosalec dkk., 2004; Chang dkk., 2002).

Tabel 2.1 menjelaskan tentang kandungan total fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan dari beberapa daerah di Indonesia, yaitu Jawa Barat (JB), Nusa Tenggara Barat (NTB), Sulawesi Selatan (SS), dan juga Kalimantan Barat (KB). Kandungan total fenolik dan flavonoid tertinggi terdapat pada sampel propolis Kalimantan Barat. Kandungan total fenolik dan flavonoid juga berpengaruh terhadap nilai aktivitas antioksidan dari propolis. Nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) terbaik juga terdapat pada sampel Kalimantan Barat (Yuliana dkk., 2013).

Tabel 2.1 Kandungan Total Fenolik, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Propoli dari Berbagai Daerah di Indonesia

| Wilayah | Total Fenolik (mg AGE/g ekstrak propolis) | Total Fenolik (mg KE/g ekstrak propolis) | Antioksidan IC ₅₀ (µg/mL) |
|---------|---|--|--------------------------------------|
| JB | 85,1 ± 8,2 | 10,19 ± 1,47 | 0,87 ± 0,14 |
| NTT | 39,9 ± 5,4 | 4,25 ± 0,98 | 2,90 ± 0,55 |
| SS | 54,1 ± 5,2 | 3,12 ± 1,26 | 1,76 ± 0,35 |
| KB | 97,4 ± 0,2 | 20,22 ± 2,45 | 0.54 ± 0,06 |

(Yuliana dkk., 2013)

Penelitian mengenai kandungan fenolik dalam propolis dari beberapa negara dijelaskan pada Tabel 2.2. Sementara itu, penelitian mengenai kandungan flavonoid dalam propolis dari beberapa negara dijelaskan pada Tabel 2.3. Berdasarkan Tabel 2.1 hingga Tabel 2.3, dapat diketahui bahwa perbedaan komposisi propolis bergantung pada kekhususan flora lokal di lokasi pengumpulan getah dalam pembuatan propolis.

Kondisi iklim di daerah pengumpulan getah juga dapat mempengaruhi komposisi senyawa dari propolis. Dabija dkk. (2008), meneliti perubahan kuantitatif asam amino dalam propolis selama musim semi (April-Mei) dan musim gugur (Agustus-September). Selama musim semi, kandungan asam amino rata-rata dalam propolis di Republik Moldova sebanyak 5,951 mg/g. Komposisi asam amino tertinggi dalam kandungan asam amino tersebut adalah asam glutamat sebanyak 15,7% ($0,939 \pm 0,110$ mg/g) dari jumlah total kandungan asam amino dalam propolis. Asam amino lainnya yang terkandung dalam propolis Republik Moldova adalah alanin, valin, glisin, leusin, isoleusin, serin, treonin, metionin, fenil alanin, tirosin, histidin, prolin, asam aspartat, arginin, lisin, sistin dan triptofan. Sementara pada musim gugur, kandungan asam amino di Republik Moldova adalah 3,426 mg/g, dimana kandungan tertinggi adalah asam glutamat sebesar 16,34%.

Tabel 2.2 Penelitian Kandungan Fenolik Propolis dari Berbagai Negara

| Negara | Kandungan Polifenolik Total (mg/g) | Refrensi |
|---------------|---|-------------------------------|
| Thailand | 12,54 – 70,04 ^a | Aumcharoen dan Phankaew, 2016 |
| Azerbaijan | 79,23 ± 2,06 ^a | Can dkk., 2015 |
| India | 180-260 ± 20 ^a | Wali dkk., 2016 |
| Korea Selatan | 48,5-238,9 ^a | Wang dkk., 2016 |
| Australia | 142,4 ± 3,61 ^a | Wang dkk., 2016 |
| Brazil | 126,8 ± 4,12 ^a | Wang dkk., 2016 |
| China | 132,1 ± 3,28 ^a | Wang dkk., 2016 |
| Algeria | 55-279 ^a | Boufadi dkk., 2014 |
| Argentina | 257-393 ^a | Lima et dkk., 2009 |
| Jepang | 53-431 ^a | Hamasaka dkk., 2004 |
| Maroko | 0,74-91,22 ^b | da Graça Miguel dkk., 2014 |
| Polandia | 150-197 ^a | Socha et dkk., 2015 |

Keterangan: ^{a)} mg Asam Galat Ekivalen/ g ekstrak propolis ^{b)} mg Asam Kafeat Ekivalen/ g ekstrak propolis

Tabel 2.3 Penelitian Kandungan Flavonoid Propolis dari Berbagai Negara

| Negara | Kandungan Flavonoid Total (mg/g) | Refrensi |
|---------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Thailand | 1,13–8,99 ^a | Aumcharoen dan Phankaew, 2016 |
| India | 45-105 ^b | Wali dkk., 2016 |
| Korea Selatan | 20,8-36,5 ^b | Wang dkk., 2016 |
| Australia | 38 ^b | Wang dkk., 2016 |
| Brazil | 53 ^b | Wang dkk., 2016 |
| China | 32,5 ^b | Wang dkk., 2016 |
| Algeria | 10-69 ^b | Boufadi dkk., 2014 |
| Argentina | 66-133 ^b | Lima dkk., 2009 |
| Jepang | 0,2-34,27 ^b | Hamasa dkk., 2004 |
| Maroko | 18-113 ^b | da Graça Miguel dkk., 2014 |
| Polandia | 36-62 ^b | Socha dkk., 2015 |

Keterangan: ^{a)} mg Katekin Ekivalen/g ekstrak propolis ^{b)} mg Kuersetin Ekivalen/g ekstrak propolis

2.1.2 Ekstraksi Propolis

Pada propolis mentah, masih banyak terdapat beberapa pengotor di dalamnya, seperti debu, serpihan kayu, serbuk sari, atau koloni lebah yang mati di dalam sarangnya. Oleh karena itu, supaya dapat diproses lebih lanjut, maka propolis mentah tersebut harus dibersihkan dan diekstrak terlebih dahulu (Nugraheni, 2013). Ekstraksi adalah teknik pemisahan yang didasarkan pada distribusi komponen sampel ke dalam dua sistem/ fase yang tidak saling bercampur, bisa berupa fase cair-cair, maupun cair-padat. Dengan demikian ekstraksi bahan bioaktif propolis adalah pemisahan komponen bioaktif tertentu dari sampel propolis menggunakan suatu pelarut tertentu (Margaretha, 2012). Metode ekstraksi maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling

banyak digunakan untuk mengekstrak senyawa antioksidan dari suatu produk bahan alam, baik dari tanaman, maupun dari hewan, dikarenakan metode yang sederhana dan biaya yang murah (Peschel dkk., 2006; Sultana dkk., 2009). Pada metode ekstraksi maserasi, sampel propolis mentah dengan berat tertentu ditempatkan dalam suatu wadah tertutup berisi pelarut dalam volume tertentu, kemudian didiamkan selama jangka waktu tertentu dalam suhu kamar, lalu disaring, sehingga mendapatkan ekstrak propolis dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi (Handa dkk., 2008). Pemilihan pelarut merupakan faktor yang sangat penting dalam metode maserasi. Pelarut yang digunakan haruslah mempunyai karakteristik yang sesuai dengan karakteristik senyawa yang ingin diekstrak (Peschel dkk., 2006; Sultana dkk., 2009).

Pelarut alkohol seperti metanol dan juga etanol, merupakan pelarut yang paling umum digunakan untuk mengekstrak propolis. Konsentrasi alkohol yang paling banyak digunakan untuk mengekstrak propolis adalah 70%, karena dalam konsentrasi ini banyak senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam propolis dapat terekstrak dengan baik, tanpa adanya lilin lebah yang ikut terekstrak. Pelarut lainnya yang biasa digunakan untuk mengekstrak propolis adalah air. Penggunaan air sebagai pelarut hanya dapat melarutkan sebagian kecil dari senyawa aktif penyusun propolis atau sekitar 10% dari berat propolis. Sebaliknya, dengan menggunakan pelarut etanol 70% dapat melarutkan hingga 50-70% dari berat propolis (Bankova dkk., 1992). Menurut Pietta dkk. (2002), proses ekstraksi propolis dengan menggunakan pelarut etanol akan menghasilkan produk yang mengandung senyawa-senyawa polifenol yang berlimpah. Pelarut semipolar yang efektif untuk mengekstrak senyawa senyawa fenolik adalah etil asetat (Peschel dkk., 2006).

Pengaruh dari jenis pelarut terhadap kandungan total flavonoid dalam propolis yang berhasil terekstrak, pernah diteliti oleh Pujirahayu dkk. (2014). Dalam penelitian tersebut, jenis pelarut yang digunakan adalah etanol 70%, propilen glikol, aquades, minyak zaitun dan minyak kelapa murni. Kandungan total

flavonoid tertinggi terdapat pada ekstrak propolis propilen glikol sebesar $0,55 \pm 0,01 \mu\text{g/mg}$ propolis. Sementara itu, pada ekstrak etanol kandungan total flavonoid sebesar $0,33 \pm 0,02 \mu\text{g/mg}$ propolis, ekstrak aquades $0,22 \pm 0,01 \mu\text{g/mg}$ propolis, ekstrak minyak zaitun $0,2 \pm 0,04 \mu\text{g/mg}$ propolis dan ekstrak minyak kelapa murni $0,25 \pm 0,01 \mu\text{g/mg}$ propolis.

Pemilihan jenis pelarut juga mempengaruhi kandungan senyawa fenolik yang terekstrak dari propolis. Pada penelitian yang dilakukan oleh Talla dkk. (2014), kandungan total senyawa fenolik tertinggi terdapat pada ekstrak propolis akuades, yakni sebesar $8,64 \pm 0,47 \text{ g asam galat/100g}$ propolis. Kandungan total fenolik dari ekstrak propolis lainnya adalah: ekstrak propolis heksana ($2,46 \pm 0,73 \text{ g/100g}$), ekstrak propolis etil asetat ($2,32 \pm 0,37 \text{ g/100g}$), ekstrak propolis etanol ($4,51 \pm 0,51 \text{ g/100g}$) dan ekstrak propolis metanol ($5,7 \pm 0,53 \text{ g/100g}$).

2.1.3 Aktivitas Antioksidan Propolis

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya (Regina dkk., 2008). Hal ini menyebabkan radikal bebas menjadi sangat reaktif menyerang sel dan jaringan dalam tubuh untuk menstabilkan dirinya, sehingga dapat menyebabkan rusaknya sel dan jaringan dalam tubuh. Jumlah radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif sel, yaitu ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan, dengan radikal bebas dalam tubuh. Hal tersebut dapat memicu terjadinya berbagai penyakit degeneratif, seperti hipertensi, diabetes militus dan kanker (Juniarti dkk., 2009).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel-sel dalam tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh reaksi oksidasi berantai senyawa radikal bebas (Sies, 1997). Antioksidan dapat menghambat proses oksidasi radikal bebas terhadap sel tubuh, dengan cara mendonorkan satu elektron atau satu atom hidrogennya pada senyawa radikal dalam tubuh, sehingga senyawa radikal tersebut menjadi terstabilkan (Miyake dan Shibamoto, 1997).

Menurut sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan alami ditemukan pada hampir semua tumbuhan, mikroorganisme, fungi, bahkan pada jaringan hewan. Kebanyakan senyawa antioksidan alami merupakan kelompok senyawa polifenol, terutama tokoferol, asam fenolik dan flavonoid. Flavonoid merupakan komponen yang paling banyak terdapat dalam tumbuhan. Lebih dari 8000 senyawa-senyawa polifenol, termasuk lebih dari 4000 senyawa-senyawa flavonoid telah diidentifikasi dari berbagai macam spesies tanaman dan jumlah ini masih akan terus bertambah. Flavonoid merupakan antioksidan yang sangat baik dan telah terbukti dapat mereduksi oksidasi dari kolesterol jahat (*Low Density Lipoprotein*), yang merupakan penyebab terjadinya penyakit kardiovaskular (Gülçin, 2012).

Salah satu produk bahan alam yang mengandung senyawa antioksidan adalah propolis. Aktivitas antioksidan dari propolis, bergantung pada komposisi senyawa penyusunnya. Salah satu senyawa yang memberikan efek antioksidan dari suatu propolis adalah kelompok senyawa polifenolik, terutama senyawa flavonoid (Sarastrani dkk., 2002). Menurut Giorgi. (2000), senyawa-senyawa golongan flavonoid mempunyai kemampuan untuk mereduksi radikal bebas. Propolis mengandung senyawa flavonoid terbanyak daripada produk-produk lebah lainnya, seperti madu, *royal jelly*, dan pollen (Siregar dkk., 2011). Tabel 2.4 menjelaskan tentang beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan dari propolis di Indonesia. Berdasarkan tabel tersebut terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pertama, faktor perbedaan jenis lebah penghasil propolis, kondisi geografis sumber tanaman yang digunakan oleh lebah untuk membuat propolis dan faktor pelarut yang digunakan dalam mengekstrak senyawa-senyawa bioaktif dalam propolis.

Tabel 2.4 Penelitian Aktivitas Antioksidan Propolis di Indonesia

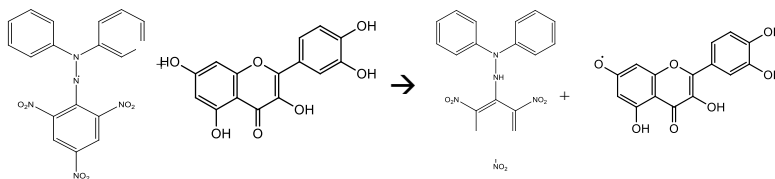
| Spesies Lebah | Daerah | Aktivitas Antioksidan | Refrensi |
|--|--|--|--------------------|
| <i>Apis mellifera</i> lokal <i>Apis mellifera</i> impor | Lawang, Jawa Timur | 57,510 ± 3,027 % 64,386 ± 1,848 % | Nugraheni, 2016 |
| <i>Trigona</i> sp. | Pandeglang Kendal Banjarmasin Makassar Pekanbaru | 68,935 ± 5,63 (100 µg/mL) 144,06 ± 52,53 (100 µg/mL) 4162,61 ± 845,9 (100 µg/mL) 1125,56 ± 133 (100 µg/mL) 308,88 ± 12 (100 µg/mL) | Hasan dkk., 2014 |
| <i>Apis mellifera</i> EPEt EPEA EPH | Jawa Barat | 52,01 ± 0,16 µg/mL 53,15 ± 0,36 µg/mL 43,94 ± 0,24 µg/mL | Novilla dkk., 2014 |

Keterangan: EPEt = Ekstrak Propolis Etanol; EPEA: Ekstrak Propolis Etil Asetat; EPH: Ekstrak Propolis Heksana

2.2 Uji Antioksidan Metode DPPH

Senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil atau yang biasa dikenal dengan DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang banyak digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan. Senyawa ini akan bereaksi dengan senyawa yang memiliki sifat antioksidan, dimana senyawa antioksidan ini akan mendonorkan satu elektronnya untuk menstabilkan senyawa DPPH radikal tersebut (Hidayati, 2015). Senyawa DPPH merupakan senyawa berwarna ungu tua, yang akan memberikan nilai absorbansi maksimum pada kisaran panjang gelombang 512-520 nm. Pada saat senyawa ini bereaksi dengan senyawa antioksidan, maka DPPH akan berubah warna dari ungu tua menjadi berwarna kuning (Carmona-Jiménez dkk., 2014). Metode DPPH merupakan metode untuk mengukur aktivitas antioksidan yang mempunyai kelebihan yaitu sederhana, cepat dan terbukti akurat (Prakash dkk., 2001). Cara kerja metode ini yang sederhana, dimana cukup dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis, membuat metode ini banyak digunakan untuk mengukur aktifitas antioksidan (Karadag dkk., 2009).

Gambar 2.2 menunjukkan prinsip kerja dari senyawa DPPH, di mana senyawa ini akan menangkap donor elektron ataupun atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Interaksi tersebut akan menyebabkan terjadinya perubahan warna serapan maksimum dari ungu menjadi kuning, pada panjang gelombang maksimum 515-520 nm. Perubahan warna ini diikuti dengan penurunan nilai absorbansi senyawa. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa radikal DPPH telah berikatan dengan antioksidan, sehingga DPPH tidak memberikan serapan pada panjang gelombang 517 nm (Martysiak-Żurowska dan Wenta, 2012).

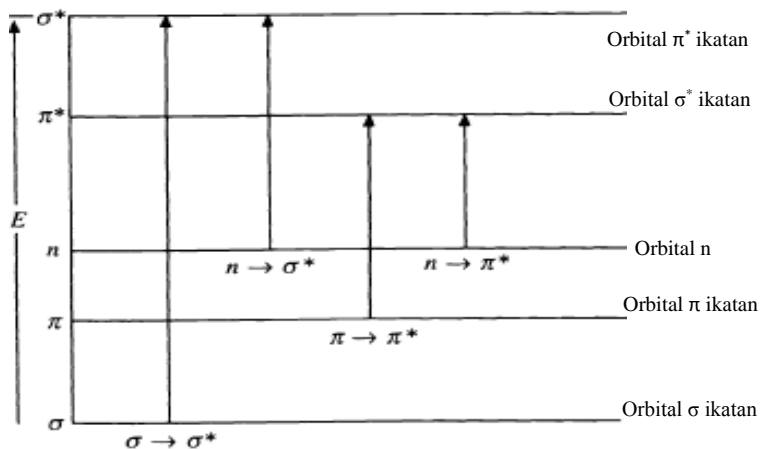


Gambar 2.2 Mekanisme Reaksi Kuersetin dengan DPPH

2.3 Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur jumlah radiasi sinar ultraviolet dan sinar tampak yang diserap oleh sampel. Panjang gelombang dari sinar tampak berkisar antara 400 nm hingga 800 nm, sementara sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang yang berkisar 190 hingga 400 nm, di mana pada daerah panjang gelombang 10-200 nm disebut sebagai daerah ultraviolet jauh atau ultraviolet vakum dan daerah 200-400 nm disebut daerah ultraviolet dekat (Yadav, 2005).

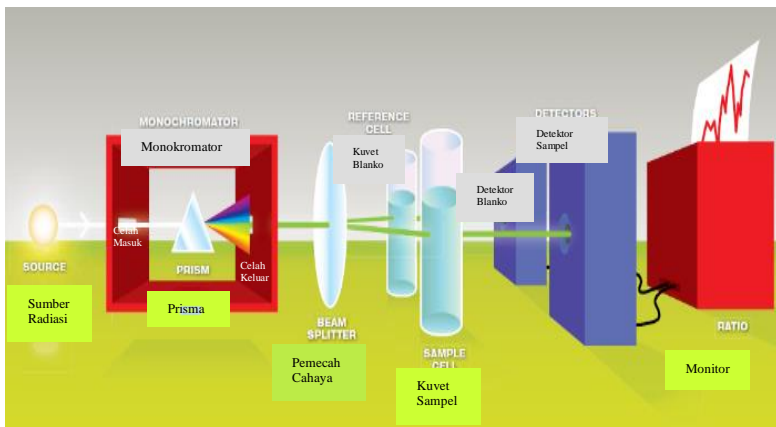
Penyerapan sinar ultraviolet dan sinar tampak oleh suatu molekul organik, akan menyebabkan transisi elektron, yaitu promosi elektron dari orbital keadaan dasar berenergi rendah, ke orbital keadaan tereksitasi berenergi tinggi, yang dikenal sebagai orbital elektron “*anti bonding*”, biasanya dilambangkan dengan lambang orbital berbintang (*). Terdapat tiga jenis distribusi elektron dalam molekul senyawa organik, yang dikenal sebagai orbital elektron pi (π), sigma (σ) dan elektron tidak berpasangan (n). Supaya ikatan sigma tereksitasi ($\sigma \rightarrow \sigma^*$), maka diperlukan energi yang sangat tinggi dan akan memberikan serapan pada daerah panjang gelombang yang rendah yaitu pada kisaran 120-200 nm. Daerah ini dikenal sebagai daerah ultraviolet hampa (*ultraviolet vacuum*), karena pada saat pengukuran tidak diperbolehkan adanya udara, sehingga sukar dilakukan dan relatif tidak memberikan keterangan untuk penentuan struktur. Oleh karena alasan itulah pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang di atas 200 nm. Jenis transisi elektronik lainnya pada region ultraviolet dan tampak adalah ($n \rightarrow \sigma^*$), yang biasa terjadi pada senyawa-senyawa alkohol dan alkil halida. ($\pi \rightarrow \pi^*$), yang disebabkan karena ikatan rangkap dua atau tiga pada molekul dan ($n \rightarrow \pi^*$), pada senyawa-senyawa aldehyd dan keton. sebagaimana yang terdapat pada Gambar 2.3 (Mulja dan Suharman, 1995; Supratman, 2010; Yadav, 2005).



Gambar 2.3 Jenis-Jenis Transisi Elektron

Sumber: (Yadav, 2005)

Skema kerja dari spektrofotometer UV-Vis, secara singkat dapat dilihat pada Gambar 2.4. Pada Gambar 2.4, sumber cahaya dari spektrofotometer UV-Vis yang berasal dari lampu deuterium, untuk panjang gelombang 190 nm hingga 380 nm. Selanjutnya, untuk panjang gelombang 380 nm hingga 900 nm, digunakan sumber radiasi tungstein, yang merupakan campuran dari filamen tungsten dan gas iodin. Cahaya yang dihasilkan merupakan cahaya putih dengan berbagai macam panjang gelombang, atau yang biasa disebut dengan cahaya polikromatis. Cahaya polikromatis dari sumber radiasi ini, selanjutnya akan didispersikan menjadi cahaya monokromatis atau yang lebih dikenal dengan “me, ji, ku, hi, bi, ni, u” (merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila dan ungu). Cahaya akan masuk menuju monokromator melalui celah masuk (*enterance slit*), lalu didispersikan oleh prisma, kisi, atau kombinasi dari keduanya. Cahaya monokromatis yang dihasilkan, akan keluar melalui celah keluar dari monokromator (*exit slit*) (The Royal Society of Chemistry, 2016; Mulja and Suharman, 1995).



Gambar 2.4 Skema Kerja Spektrofotometer UV-Vis

Sumber: The Royal Society of Chemistry (2009)

Setelah melewati monokromator, cahaya monokromatis diarahkan melewati alat pemecah cahaya (*beam splitter*), akan dibagi menjadi dua. Pertama, cahaya tersebut akan diarahkan melewati kuvet yang berisi sampel yang akan dianalisa dan sebagian cahaya lainnya diarahkan melewati kuvet yang berisi larutan blanko. Jika senyawa yang akan dianalisa menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, maka intensitas cahaya sampel (I_s), akan lebih kecil daripada intensitas cahaya blanko (I_b) (Solomon, 1976)

Setelah melewati sampel dan blanko, cahaya monokromatis akan menuju detektor. Pada detektor, sinyal radiasi yang datang akan dikonversi menjadi sinyal elektronik (Rouessac dan Rouessac, 1994). Selanjutnya, didapatkan data berupa spektrum grafik absorbansi terhadap panjang gelombang (Solomon, 1976).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kertas saring whatman, pipet tetes, kuvet plastik, kuvet kaca, gelas beker 50 mL, gelas beker 100 mL, gelas beker 250 mL, erlenmeyer 100 mL tabung reaksi dan rak, alumunium foil, plastik wrap, pipet ukur 10 mL, pipet ukur dua mL, pipet ukur satu mL, propipet, labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 25 mL, corong pisah, kaca arloji, botol semprot, spatula kaca, spatula besi, botol coklat 100 mL, botol vial dua mililiter, oven, lemari asam, lemari pengering, lemari pendingin, neraca analitik dan *freeze dryer*. Instrumen yang digunakan adalah kromatografi gas-spektrometer massa (KG-SM) dan spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sarang lebah (*Trigona* sp.) yang dibeli dari wisata “Petik Madu” Lawang, Malang, Jawa Timur, etanol 70%, etanol 96% (Merck), metanol, etil asetat, reagen Folin Ciocalteu (Merck), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), asam galat (Sigma-Aldrich), asam sulfat 98% (Smartlab Indonesia), natrium nitrit (Merck), natrium hidroksida (Merck), kuersetin (Sigma-Aldrich), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich), reagen bradford (Sigma-Aldrich) dan aquades.

3.3 Prosedur

3.3.1 Ekstraksi Propolis

Prosedur ekstraksi propolis menggunakan metode maserasi sebagaimana yang telah dilakukan oleh Choudhari dkk (2012), dengan sedikit modifikasi. Pertama ditimbang 1 gram propolis mentah, lalu ditambah dengan 20 mL masing-masing pelarut etanol 70% dalam gelas beaker 50 mL. Setelah ditambahkan pelarut, beaker glass ditutup dengan plastik wrap dan alumunium foil, lalu disimpan selama 7 hari di tempat gelap, dan suhu ruang. Prosedur yang sama diulang untuk pelarut metanol dan etil asetat.

3.3.2 Penentuan Kandungan Polifenolik Total

Penentuan kandungan total polifenolik dilakukan berdasarkan prosedur dari Laskar dkk. (2010), dengan sedikit modifikasi. Satu mililiter ekstrak propolis ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades dengan perbandingan (1:50) dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu ditambah dengan 4.0 mL larutan Na_2CO_3 0,4 M. Selanjutnya, Campuran diinkubasi di ruang gelap dan suhu ruang selama 2 jam. Setelah 2 jam inkubasi, sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Blanko yang digunakan terdiri dari 1 mL pelarut, 5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 4 mL Na_2CO_3 0,4 M. Standar yang digunakan adalah asam galat dengan variasi konsentrasi 100,80,60,40 dan 20 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*). Hasil analisa kandungan fenolik total dinyatakan dalam satuan μg Asam Galat Ekuivalen (AGE)/g sarang lebah kering.

3.3.3 Penentuan Kandungan Total Flavonoid

Penentuan kandungan flavonoid total dilakukan dengan mencampurkan 0,4 mL dari ekstrak etanol propolis dengan 9,6 mL akuades, 1,2 mL H_2SO_4 0,2 M dan 1,2 mL NaNO_2 3 M. Selanjutnya ditambah dengan 1,2 mL NaOH 10%. Setelah itu larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap, lalu diukur nilai absorbansi dengan panjang gelombang 395 nm. Larutan blanko yang digunakan untuk mengukur sampel ekstrak propolis adalah campuran antara 0,4 mL pelarut, 9,6 mL akuades, 1,2 mL H_2SO_4 0,2 M, 1,2 mL NaNO_2 dan 1,2 mL NaOH 10%). Standar yang digunakan adalah kuersetin dengan variasi konsentrasi 100,80,60,40 dan 20 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran masing-masing ekstrak dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) (Nugraheni, 2013). Hasil analisa kandungan flavonoid total dinyatakan dalam satuan μg Kuersetin Ekuivalen (KE)/g sarang lebah kering.

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengukuran aktifitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sebagaimana yang telah dilakukan oleh Campos dkk. (2014). Satu mililiter ekstrak propolis, ditambah dengan 9 mL larutan DPPH 0,11 M. Campuran yang dihasilkan kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm. Pengukuran absorbansi diulangi sebanyak tiga kali. Metode yang sama diulang pada ekstrak propolis metanol dan etil asetat. Hasil analisa aktivitas antioksidan dinyatakan dalam bentuk persentase (%) dekolorasi, yang juga melambangkan % aktivitas penghambatan radikal bebas. Persentase penghambatan dapat dihitung dengan persamaan 3.1.

$$\text{Aktivitas penghambatan (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \right) \times 100\%$$

(3.1)

“Halaman ini sengaja diokosongkan”

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Propolis

Propolis merupakan senyawa resin berwarna coklat dan lengket yang diproduksi oleh lebah madu (Crane, 1988). Sampel propolis yang digunakan merupakan propolis dari sarang lebah *Trigona* sp., yang didapatkan dari Taman Wisata Petik Madu di Desa Kalirejo, Kecamatan Lawang, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Sarang lebah *Trigona* sp., berwarna coklat, lengket, dengan bentuk yang tidak teratur, sebagaimana pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Sarang Lebah *Trigona* sp.

Propolis mentah yang terdapat dalam sarang lebah *Trigona* sp. masih bercampur dengan beberapa pengotor yang terdapat dalam sarang lebah, seperti kayu, debu dan roti lebah (*bee pollen*). Oleh karena itu, supaya dapat digunakan lebih lanjut, propolis harus dibersihkan dan diekstraksi terlebih dahulu (Nugraheni, 2013). Sebelum dilakukan ekstraksi, sarang lebah dikeringkan dan dibersihkan terlebih dahulu dari serpihan kayu dan roti lebah (*bee pollen*).

Proses pengeringan sarang lebah bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam propolis. Pengeringan sarang lebah

dilakukan dengan cara dijemur selama 3 hari. Persentase kadar air yang terdapat dalam sarang lebah adalah 7,13%. Hasil ini kurang lebih sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Cunha. dkk (2004), yakni berkisar antara 4,6 sampai 9,4%.

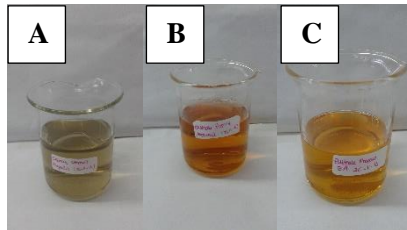
Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Perbandingan massa sarang lebah dengan pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah 1:20. Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang terkandung dalam propolis adalah etanol 70%, metanol dan etil asetat. Pemilihan pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda bertujuan untuk mengetahui pelarut yang efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa polifenolik dan flavonoid dalam propolis. Jenis pelarut yang digunakan berpengaruh terhadap hasil ekstraksi propolis, baik itu berupa warna ataupun volume ekstrak, sebagaimana yang terdapat dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Ekstraksi Propolis

| Nama Ekstrak | Warna | V ₀ (mL) | V _t (mL) |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| EpEt (B) | Cokelat muda | 80 | 71,7 |
| EpMe (A) | Cokelat | 80 | 62 |
| EpEa (C) | Cokelat Kekuningan | 80 | 49,5 |

Keterangan: EPEt: Ekstrak Propolis Etanol; EPMe: Ekstrak Propolis Metanol; EPEa: Ekstrak Propolis Etil Asetat

Ekstraksi propolis dengan pelarut metanol, menghasilkan ekstrak dengan warna cokelat. Sementara ekstrak propolis etanol 70% dan etil asetat berwarna cokelat muda dan cokelat kekuningan, sebagaimana yang terdapat dalam Gambar 4.2. Perbedaan warna hasil ekstraksi propolis dari ketiga pelarut, menunjukkan perbedaan jumlah senyawa-senyawa yang dapat terekstrak. Tingginya intensitas warna ekstrak propolis menunjukkan tingginya kandungan polifenolik dan flavonoid propolis dari ekstrak propolis tersebut (Tukan, 2008).



Gambar 4.2 Ekstrak Propolis dengan Pelarut: (A) Etanol 70% (B) Metanol (C) Etil Asetat

4.2 Kandungan Fenolik Total

Senyawa-senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang tersebar luas pada tanaman (Gülçin dkk., 2010). Setiap tumbuh-tumbuhan memiliki struktur komponen fenolik yang berbeda. Terdapat komponen fenolik yang memiliki gugus OH dalam jumlah sedikit dan ada juga komponen fenolik yang mempunyai gugus OH dalam jumlah yang banyak. Gugus OH berperan dalam proses transfer elektron, untuk menstabilkan dan meredam radikal bebas. Oleh karena itu keberadaan senyawa-senyawa fenolik dalam propolis dapat menentukan aktivitas antioksidan dari propolis (Indrawati dan Razimin, 2013).

Beberapa pelarut yang dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dalam propolis adalah etil asetat, kloroform, n-butanol, air, metanol dan etanol (Sun dkk., 2015). Kelarutan senyawa polifenolik bergantung pada keberadaan gugus hidroksil, serta panjangnya gugus alkil dalam senyawa polifenolik. Semakin banyak gugus hidroksil (-OH), maka senyawa tersebut mudah larut dalam pelarut polar (Iloki-Assanga dkk., 2015). Pengukuran kandungan total fenolik dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri, menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dengan asam galat sebagai senyawa standar.

Nilai kandungan total fenolik dari ekstrak propolis metanol, etanol dan etil asetat mempunyai nilai yang berbeda-beda. Sebagaimana yang terdapat dalam Tabel 4.2, nilai kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada ekstrak propolis metanol dengan

nilai $498,925 \pm 6,322 \mu\text{g/g}$ sarang lebah kering, yang kemudian diikuti oleh ekstrak propolis etil asetat dan etanol 70%.

Tabel 4.2 Kandungan Fenolik Total

| Nama Ekstrak | Kandungan Total Fenolik ($\mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering) |
|--------------|---|
| EPMe | $498,925 \pm 6,322$ |
| EPEA | $140,302 \pm 9,541$ |
| EPEt | $104,628 \pm 0,583$ |

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa nilai kandungan fenolik tertinggi terdapat pada ekstrak propolis metanol. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Iloki-Assanga dkk. (2015), yang mengatakan bahwa metanol merupakan pelarut yang paling efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa fenolik. Namun dalam penelitian yang dilakukan oleh Do dkk. (2014), pelarut yang paling efektif dalam mengekstrak senyawa fenolik adalah etanol 100%. Kandungan senyawa fenolik pada ekstraksi dengan menggunakan pelarut alkohol akan menurun seiring dengan meningkatnya kandungan air dalam pelarut alkohol tersebut. Dalam penelitian Do dkk. (2014), kandungan fenolik mengalami penurunan dengan urutan 100% etanol > 75% etanol > 50 % etanol. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, dimana ekstrak propolis etanol 70%, mempunyai nilai kandungan fenolik yang paling rendah. Kandungan fenolik ekstrak propolis etil asetat lebih tinggi dari ekstrak propolis etanol. Hal tersebut dimungkinkan karena struktur senyawa fenolik dalam propolis *Trigona* sp., mengandung substituen rantai hidrokarbon yang panjang, sehingga dapat larut dengan baik dalam pelarut semipolar, seperti etil asetat.

Kandungan fenolik dari ketiga ekstrak propolis *Trigona* sp. ini jauh lebih tinggi daripada kandungan fenolik ekstrak propolis *Apis mellifera*, baik lokal, maupun impor (Nugraheni dkk., 2016). Kandungan fenolik total propolis *Apis mellifera* lokal sebesar $0,379 \pm 0,007 \mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering. Sementara pada propolis *Apis mellifera* impor sebesar $0,664 \pm 0,038 \mu\text{g AGE/g}$

sarang lebah kering. Hasil ini menunjukkan perbedaan spesies lebah juga sangat mempengaruhi kandungan total fenolik dari ekstrak propolis. Tingginya kandungan fenolik dari ekstrak propolis *Trigona* sp., menunjukkan bahwa propolis *Trigona* sp., mempunyai kualitas yang lebih baik daripada propolis *Apis* sp.

4.3 Kandungan Flavonoid Total

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol yang banyak ditemukan dalam propolis, dan paling banyak dieksplorasi dikarenakan mempunyai berbagai sifat farmakologi. Salah satu sifat farmakologi dari senyawa-senyawa flavonoid adalah aktivitas antioksidan (Arts dan Hollman 2005). Kekuatan aktivitas antioksidan senyawa flavonoid bergantung pada jumlah gugus OH dalam senyawa tersebut (Indrawati dan Razimin, 2013).

Flavonoid terdapat secara alami dalam tanaman terikat dengan gugus gula (glikosida) ataupun tanpa gugus gula (aglikon). Aglikon flavonoid yang sedikit polar, seperti isoflavon, flavon dan *methylated flavones* dapat terekstrak dengan baik dalam pelarut non polar hingga semipolar, seperti kloroform, diklorometana, dietil eter dan etil asetat. Sementara glikosida flavonoid dan aglikon flavonoid polar dapat terekstrak dengan baik menggunakan pelarut polar, seperti etanol, metanol, akuades, ataupun campuran pelarut alkohol dan air (Marston dkk., 2006). Pengukuran kandungan total flavonoid dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri, menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*) dengan kuersetin sebagai senyawa standar.

Nilai kandungan flavonoid total mempunyai kecenderungan yang sama dengan kandungan fenolik total. Kandungan flavonoid total tertinggi terdapat pada ekstrak propolis metanol dengan nilai $129,265 \pm 2,166 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering, kemudian diikuti dengan ekstrak propolis etil asetat dan etanol 70%. Hasil Kandungan flavonoid total dari ketiga ekstrak propolis disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kandungan Flavonoid Ekstrak Propolis

| Nama Ekstrak | Kandungan Total Flavonoid ($\mu\text{g KE/g propolis}$) |
|--------------|--|
| EPMe | $129,265 \pm 2,166$ |
| EPEA | $12,088 \pm 0,553$ |
| EPEt | $0,405 \pm 0,064$ |

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang paling efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa flavonoid dalam propolis. Sebaliknya, pelarut etanol 70% merupakan pelarut yang paling tidak efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa flavonoid dalam propolis *Trigona* sp. Penelitian yang dilakukan oleh Do dkk. (2014), menyatakan bahwa nilai kandungan flavonoid total mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya kandungan air dalam pelarut. Tingginya nilai kandungan flavonoid pada ekstrak propolis etil asetat, menandakan bahwa dimungkinkan dalam propolis *Trigona* sp. yang digunakan dalam penelitian ini mengandung banyak senyawa-senyawa aglikon flavonoid, seperti isoflavan, flavon dan *methylated flavones*.

Hasil kandungan flavonoid total dari ekstrak propolis *Trigona* sp., dengan pelarut metanol dan etil asetat lebih tinggi daripada kandungan flavonoid total dari ekstrak propolis *Apis mellifera* dalam penelitian yang dilakukan oleh Nugraheni dkk (2016). Kandungan flavonoid total dari propolis *Apis mellifera* lokal sebesar $0,913 \pm 0,002 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering, sementara propolis *Apis mellifera* impor sebesar $1,831 \pm 0,009 \mu\text{g KE/g}$ sarang lebah kering. Hasil ini menunjukkan perbedaan spesies lebah juga sangat mempengaruhi kandungan total flavonoid dari ekstrak propolis. Kandungan flavonoid yang tinggi dari ekstrak propolis *Trigona* sp., menunjukkan bahwa propolis *Trigona* sp., mempunyai kualitas yang lebih baik daripada propolis *Apis mellifera*.

4.4 Aktivitas Antioksidan Propolis

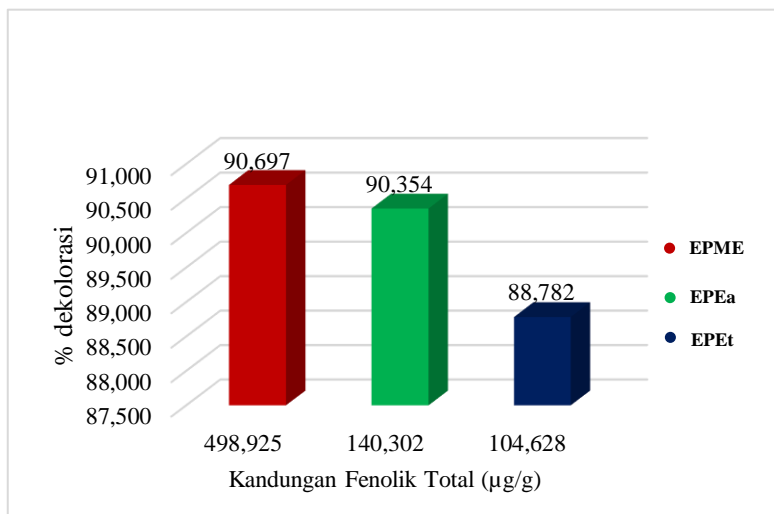
Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul tidak stabil yang disebut sebagai radikal bebas (Sies, 1997). Aktivitas antioksidan disajikan dalam bentuk persentase dekolorasi (%), dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa radikal yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Senyawa DPPH mempunyai absorbansi maksimum pada rentang panjang gelombang 515 – 520 nm (Martysiak-Zurowska dan Wenta, 2012). Pada penelitian ini pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 517 nm, sebagaimana yang dilakukan oleh Campos dkk. (2014).

Dalam penelitian ini pengukuran persentase dekolorasi dilakukan pada konsentrasi 100%, dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan kondisi optimum untuk mengukur persentase dekolorasi dari ekstrak propolis, sebagaimana yang telah dilakukan oleh Nugraheni dkk. (2016). Ekstrak propolis metanol mempunyai % dekolorasi yang paling tinggi, yaitu sebesar $90,697 \pm 0,673\%$, sementara ekstrak propolis etanol dan etil asetat mempunyai nilai persentase dekolorasi sebesar $88,782 \pm 0,098\%$ dan $90,354 \pm 0,657\%$. Nilai persentase dekolorasi dari ketiga ekstrak propolis *Trigona* sp., lebih besar daripada persentase dekolorasi ekstrak propolis *Apis mellifera* dengan menggunakan pelarut etanol 95% pada penelitian yang dilakukan oleh Nugraheni dkk. (2016). Nilai % dekolorasi pada propolis *Apis mellifera* lokal sebesar $57,510 \pm 3,027 \%$, sementara propolis *Apis mellifera* impor sebesar $64,386 \pm 1,848 \%$ (Nugraheni dkk., 2016).

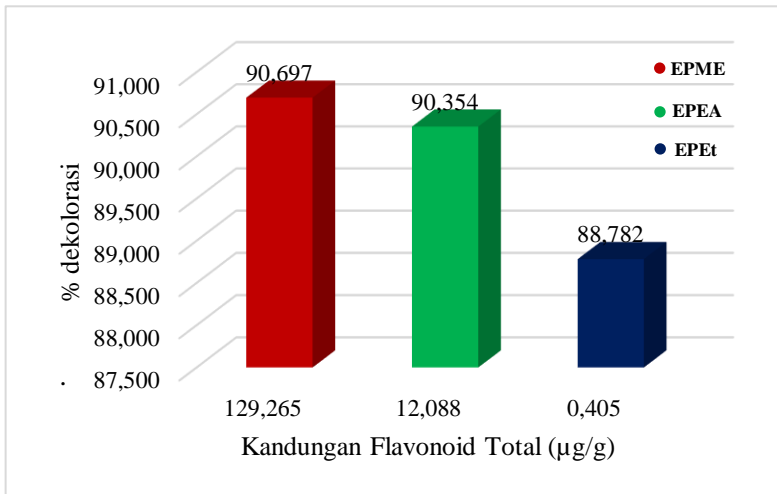
Berdasarkan gambar 4.3 dapat dilihat bahwa kandungan fenolik total dalam ekstrak propolis berdampak pada nilai aktivitas antioksidan. Ekstrak propolis metanol yang memiliki kandungan fenolik paling tinggi dibandingkan dengan kedua ekstrak propolis lainnya, memiliki persentase dekolorasi tertinggi. Persentase dekolorasi tertinggi kedua terdapat pada ekstrak propolis etil asetat yang kemudian diikuti ekstrak propolis etanol. Persentase dekolorasi ini, selaras dengan nilai kandungan fenolik ekstrak

propolis etil asetat yang lebih tinggi daripada ekstrak propolis etanol.

Nilai kandungan total flavonoid yang terdapat pada sampel ekstrak propolis *Trigona* sp., juga mempunyai pengaruh yang identik terhadap aktivitas antioksidan, dimana semakin tinggi nilai kandungan flavonoid dari ekstrak propolis, maka semakin tinggi pula persentase dekolorasinya, sebagaimana yang digambarkan pada Gambar 4.4. Ekstrak propolis metanol yang memiliki kandungan flavonoid tertinggi juga memiliki persentase dekolorasi tertinggi. Ekstrak propolis etil asetat memiliki persentase dekolorasi tertinggi kedua yang kemudian diikuti oleh ekstrak etil asetat.



Gambar 4.3 Grafik Pengaruh Kandungan Fenolik terhadap Aktivitas Antioksidan



Gambar 4.4 Grafik Pengaruh Kandungan Flavonoid terhadap Aktivitas Antioksidan

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari ketiga pelarut yang digunakan yaitu metanol, etil asetat dan etanol 70%, diketahui bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang paling efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid dalam propolis. Hal tersebut ditandai dengan tingginya nilai kandungan polifenolik dan flavonoid total dari ekstrak propolis metanol, yaitu sebesar $498,925 \pm 6,322 \mu\text{g AGE/g}$ sarang lebah kering untuk kandungan fenolik total, sementara kandungan flavonoid total dari ekstrak propolis metanol sebesar $129,265 \pm 2,166 \mu\text{g (KE)/g}$ sarang lebah kering. Kandungan fenolik total dari ekstrak propolis etil asetat dan etanol, secara berturut-turut sebesar $140,302 \pm 9,541$ dan $104,628 \pm 0,583 \mu\text{g AGE /g}$ sarang lebah kering. Kandungan flavonoid total dari ekstrak propolis etil asetat dan etanol, secara berturut-turut sebesar $12,088 \pm 0,553$ dan $0,405 \pm 0,064 \mu\text{g (KE)/g}$ sarang lebah kering. Nilai aktivitas antioksidan yang disajikan dalam bentuk persentase (%) dekolorasi dari ketiga ekstrak propolis, secara berturut-turut sebesar $90,697 \pm 0,673\%$ (EPMe), $90,354 \pm 0,657\%$ (EPEA), $88,782 \pm 0,098\%$ (EPeT).

5.2 Saran

Penelitian terhadap aktivitas antioksidan dari propolis *Trigona* sp., dari Lawang, Jawa Timur masih belum sempurna. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut terhadap komposisi senyawa-senyawa dalam propolis. Selanjutnya, diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas biologis lainnya dari propolis *Trigona* sp. di Indonesia, seperti aktivitas antibakteri, antikanker, antiinflamatori dan sebagainya. Selain itu pengolahan lebih lanjut terhadap propolis *Trigona* sp., hingga dapat dikonsumsi oleh masyarakat sebagai alternatif pengobatan secara alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Arts, I.C., Hollman, P.C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 317S–325S.
- Aumcharoen, W., Phankaew, C., 2016. Antibacterial Activity and Phenolic Content of Propolis From Four Different Areas of Thailand. *Int J Pharm Pharm Sci Rev Res* 37, 77–82.
- Bankova, V., De Castro, S., Marcucci, M., 2000. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* 31, 3–15.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., Zamjansan, Z., 1992. Propolis Produced in Bulgaria and Mongolia: Phenolic Compounds and Plant Origin. *Apidologie* 23, 79–85.
- Banskota, A.H., Teruka, Y., Adnyana, I.K., Midosikawa, M., Matsushige, K., Kadota, S., 2001. Anti-Inflammatory Effect of Propolis Through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageen-Induced Mouse Paw Edema. *Phytomedicine* 8, 16–23.
- Boufadi, Y.M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., Boudjeltia, K.Z., Van Antwerpen, P., 2014. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2327–2345.
- Campos, J.F., dos Santos, U.P., Macorini, L.F.B., de Melo, A.M.M.F., Balestieri, J.B.P., Paredes-Gamero, E.J., Cardoso, C.A.L., de Picoli Souza, K., dos Santos, E.L., 2014. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* 65, 374–380.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Asadev, A., Kolayli, S., 2015. Phenolic Profile and Antioxidant Potential of Propolis from Azerbaijan. *Mellifera* 1, 16–28.
- Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M.V., Igartuburu, J.M., Barroso, C.G., 2014. Simplification of The DPPH Assay

- for Estimating The Antioxidant Activity of Wine and Wine By-Products. *Food Chem.* 165, 198–204.
- Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, An Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia* 73, S1–S6.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* 10.
- Choudhari, M.K., Punekar, S.A., Ranade, R.V., Paknikar, K.M., 2012. Antimicrobial Activity of Stingless Bee (*Trigona* sp.) Propolis used In The Folk Medicine of Western Maharashtra, India. *J. Ethnopharmacol.* 141, 363–367.
- Crane, E., 1988. *Beekeeping: Science. Pract. World Recourses* Heinemann Lond.
- Cunha, I., Sawaya, A.C., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P. de O., 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 964–970.
- da Graça Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D., Lyoussi, B., 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* 23, 313–322.
- Dabija, T., Eremia, N., Eremia, N., 2008. The Study of The Amino Acids in Propolis Composition. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 41, 291–295.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313–7352.
- Djajasaputra, M.R.S., 2010. Potensi Budidaya Lebah *Trigona* dan Pemanfaatan Propolis Sebagai Antibiotik Alami Untuk Sapi PO.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetardjo, F.E., Imadji, S., Ju, Y.-H., 2014. Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total

- Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatica*. J. Food Drug Anal. 296–302.
- Fatoni, A., ARTIKA, I.M., HASAN, A.E.Z., 2008. Antibacterial Activity of Propolis Produced by *Trigona* spp. Against *Campylobacter* spp. HAYATI J. Biosci. 15, 161–164.
- Free, J.B., 1982. Bees and Mankind. George Allen & Unwin.
- Giorgi, P., 2000. Flavonoid an Antioxidant 63, 1035–1045.
- Gülçin, I., 2012. Antioxidant Activity of Food Constituents: an Overview. Arch. Toxicol. 86, 345–391.
- Gülçin, I., bursal, E., Sehitog˘lu, M.H., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Lyophilized Aqueous Extract of Propolis from Erzurum, Turkey. Food Chem. Toxicol. 48, 2227–2238.
- Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T., NAKAYAMA, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. Food Sci. Technol. Res. 10, 86–92.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D., 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. ICS-UNIDO, Italy.
- Hasan, A., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T., Suparno, O., Setiyono, A., 2014. Investigating the antioxidant and anticytotoxic activities of propolis collected from five regions of Indonesia and their abilities to induce apoptosis. Emir. J. Food Agric. 26, 390.
- Hasan, A., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T., Suparno, O., Setiyono, A., 2013. Optimasi Ekstraksi Propolis Menggunakan Cara Maserasi Dengan Pelarut Etanol 70% Dan Pemanasan Gelombang Mikro Serta Karakterisasinya Sebagai Bahan Antikanker Payudara. J. Teknol. Ind. Pertan.
- Hidayati, M.D., 2015. Pemisahan dan Identifikasi Antioksidan, Inhibitor α -Glukosidase dan Aldosa Reduktase dari Daun Salam (*Syzygium Polyanthum* Wight). Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Hossain, M.A., Shah, M.D., Gnanaraj, C., Iqbal, M., 2011. In Vitro Total phenolics, Flavonoids Contents and Antioxidant

- Activity of Essential Oil, Various Organic Extracts from The Leaves of Tropical Medicinal Plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 717–721.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.-L., 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19, 19610–19632.
- Iloki-Assanga, S.B., Lewis-Luján, L.M., Lara-Espinoza, C.L., Gil-Salido, A.A., Fernandez-Angulo, D., Rubino-Pino, J.L., Haines, D.D., 2015. Solvent Effects on Phytochemical Constituent Profiles and Antioxidant Activities, Using Four Different Extraction Formulations for Analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *Biomed Cent.* 8. doi:10.1186/s13104-015-1388-1
- Indrawati, N.L., Razimin, 2013. *Bawang Dayak SI Umbi Ajaib Penakluk Aneka Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta Selatan.
- Juniarti, Osmeli, D., Yuhernita, 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhydrazyl) dari Ekstrak Daun Saga. *Makara Sains* 13, 50–54.
- Karadag, A., Ozelik, B., Saner, S., 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* 2, 41–60.
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., Vladimir-Knezevic, S., 2004. Quantitative Analysis of The Flavonoids in Raw Propolis from Northern Croatia. *ACTA Pharm.-Zagreb.* 54, 65–72.
- Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A., 2010. Antioxidant Activity of Indian Propolis and Its Chemical Constituents. *Food Chem.* 122, 233–237.
- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M.P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N.S., Wunderlin, D.A., Feresin, G.E., 2009. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* 57, 2691–2698.

- Marcucci, M.C., 1995. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie* 26, 83–99.
- Margaretha, I., 2012. Kajian Senyawa Bioaktif Propolis Trigona sp. Sebagai Agen Anti Karies Melalui Pendekatan Analisis Kimia Dipandu dengan Bioassay. Universitas Indonesia.
- Marston, A., Hostettmann, K., Andersen, Ø., Markham, K., 2006. Separation and quantification of flavonoids. *Flavonoids Chem. Biochem. Appl.* 1–36.
- Martysiak-Żurowska, D., Wenta, W., 2012. A Comparison of ABTS and DPPH Methods for Assessing The Total Antioxidant Capacity of Human Milk. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11, 83–89.
- Michener, C.D., 2000. *The Bees The World*. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Miyake, T., Shibamoto, T., 1997. Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1819–1822.
- Mulja, M., Suharman, 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Nagaoka, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2003. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from The Netherlands Propolis. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 487–491.
- Novilla, A., As'ari Nawawi, G.S., Widowati, W., 2014. Antioxidative and Antibacterial Activities of Indonesian Propolis Extracts Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Vitro. *Cukurova Med. J.* 39, 224–233.
- Nugraheni, Z.V., 2013. Antibacterial Effect Against *Streptococcus Pneumoniae* of Bioactive Extracts from Natural Beehives (*Apis Mellifera*) from East Java, Indonesia. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Nugraheni, Z.V., Zetra, Y., Trianita, A.M., Syahputra, M.Y., Firmany, A.R., 2016. Antioxidant activity in natural

- beehive's (*Apis mellifera*) bioactive compound from Malang, Indonesia. Presented at the INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CURRENT PROGRESS IN MATHEMATICS AND SCIENCES 2015 (ISCPMS 2015): Proceedings of the 1st International Symposium on Current Progress in Mathematics and Sciences, AIP Publishing, p. 20053.
- Peschel, W., Sanchez-Rabneda, F., Dn, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., Condina, C., 2006. Natural Antioxidants from Vegetable and Fruit Wastes 97, 137–150.
- Pietta, P., Gardana, C., Pietta, A., 2002. Analytical Methods For Quality Control of Propolis. *Fitoterapia* 73, S7–S20.
- Prakash, A., Rigelhof, F., Miller, E., 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Lab. Anal. Prog.* 19, 1–4.
- Prasetyo, D.H., Suparyanti, E.L., 2013. Ekstrak Etanol Propolis Isolat Menurunkan Derajat Inflamasi dan Kadar Malondialdehid pada Serum Tikus Model Sepsis. *Maj. Kedokt. Bdg.* 45, 161–166.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., Uslinawati, Z., 2014. Properties and Flavonoid Content in Propolis of Some Extraction Method of Raw Propolis. *Int J Pharm Pharm Sci* 6, 338–40.
- Regina, A., Maimunah, M., Yovita, L., 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Sains Dan Teknol. Farm.* 13.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Righi, A., Negri, G., Salatino, A., 2013. Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013.
- Rouessac, F., Rouessac, A., 1994. *Chemical Analysis Modern Instrumentation Method and Techniques*. Second edition. John Willey & Sons, USA.

- Sabir, A., 2005. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (In Vitro)(In Vitro Antibacterial Activity of Flavonoids Trigona sp Propolis Against Streptococcus mutans). Dent. J. Maj. Kedokt. Gigi 38, 135–141.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F., 2011. Propolis Research and The Chemistry of Plant Products. Nat. Prod. Rep. 28, 925–936.
- Sarastrani, D., Soekarto, T.S., Tien, R., Muchtadi, Fardiaz, D., Apriyanto, A., 2002. Aktifitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Biji Atung. J. Teknol. Dan Ind. Pangan XIII, 149–156.
- Selvan, A., Prabhu, T., 2010. Extraction of Propolis from Beehives and Characterization of its Constituents and Medicinal Properties: A Review. Int J Adv Eng Tech 1, 50–3.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: Is There a Potential for The Development of New Drugs? J. Ethnopharmacol. 133, 253–260.
- Sies, H., 1997. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Exp. Physiol. 82, 291–295.
- Sihombing, D., 1997. Ilmu ternak lebah madu. Gadjah Mada University Press.
- Simone-Finstrom, M., Spivak, M., 2010. Propolis and Bee Health: The Natural History and Significance of Resin Use by Honey Bees. Apidologie 41, 295–311.
- Singh, S., 1962. Beekeeping in India. Indian Counc. Agric. Res. New Delhi.
- Siregar, H.C., Fuah, A.M., Octaviany, Y., 2011. Propolis; Madu Multikhasiat. Penebar Swadaya Grup.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., Juszczak, L., 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. Nat. Prod. Res. 29, 416–422.
- Solomon, T.W.G., 1976. Organic Chemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, USA.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on The Antioxidant Activity of

- Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 14, 2167–2180.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., Zhang, H., 2015. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. Hindawi Publ. Corp.
- Supratman, U., 2010. Elusidasi Struktur Senyawa Organik, Metode Spektroskopi Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik. Widya Padjadjaran.
- Suranto, A., 2007. Dahsyatnya Propolis untuk Menggempur Penyakit. Gramedia Pustaka Utama.
- Suseno, D., 2009. Aktivitas Antibakteri Propolis *Trigona* spp. Pada Dua Konsentrasi Berbeda Terhadap Cairan Rumen Sapi. Skripsi. Insititut Pertanian Bogor, Bogor.
- Susilo, B., Mertaniasih, N.M., Koendhori, E.B., Agil, M., 2009. Komposisi Kimiawi dan Aktivitas Antimikroba Propolis dari Malang Jawa Timur. *J Penelit Med Eksakta* 8, 23–30.
- Syamsudin, Dewi, R.M., Kusmardi, 2008. Immunomodulatory and in vivo Antiplasmodial Activities of Propolis Extracts. *Glob. J. Pharmacol.* 2, 37–40.
- Talla, E., Tamfu, A.N., Biyanzi, P., Sakava, P., Asobo, F.P., Mbafor, J.T., Ndjouenkeu, R., 2014. Phytochemical Screening, Antioxidant Activity, Total Polyphenols, and Flavonoids Content of Different Extracts of Propolis from Tekel (Ngaoundal, Adamawa region, Cameroon). *J Phytopharm* 3, 321–9.
- The Royal Society of Chemistry, 2016. Introduction to Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV).
- Tukan, G.D., 2008. Pengaruh Propolis *Trigona* spp Asal Pandeglang Terhadap Beberapa Isolat Bakteri Usus Sapi dan Penelusuran Komponen Aktifnya. Insititut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wali, A.F., Mushtaq, A., Rehman, M.U., Akbar, S., Massodi, M.H., 2016. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Propolis from Kashmir Himalaya Region. *Free Rad Antiox* 6.

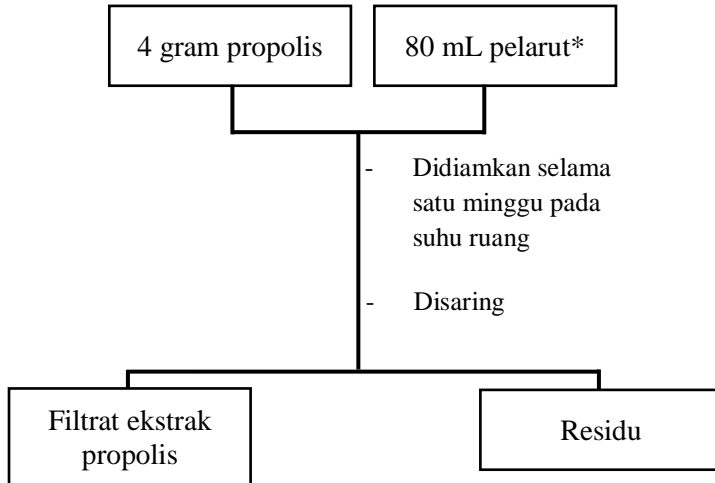
- Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S.O., Kwon, H.W., Perumalsamy, H., Ahn, Y.-J., 2016. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 1.
- Yadav, L.D.S., 2005. *Organic Spectroscopy*. Springer, Dordrecht.
- Yuliana, N.D., Wijaya, C.H., Nasrullah, N., 2013. Classification of *Trigona* spp Bee Propolis from Four Regions in Indonesia using FTIR Metabolomics Approach. Presented at the 13th ASEAN Food Conference.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

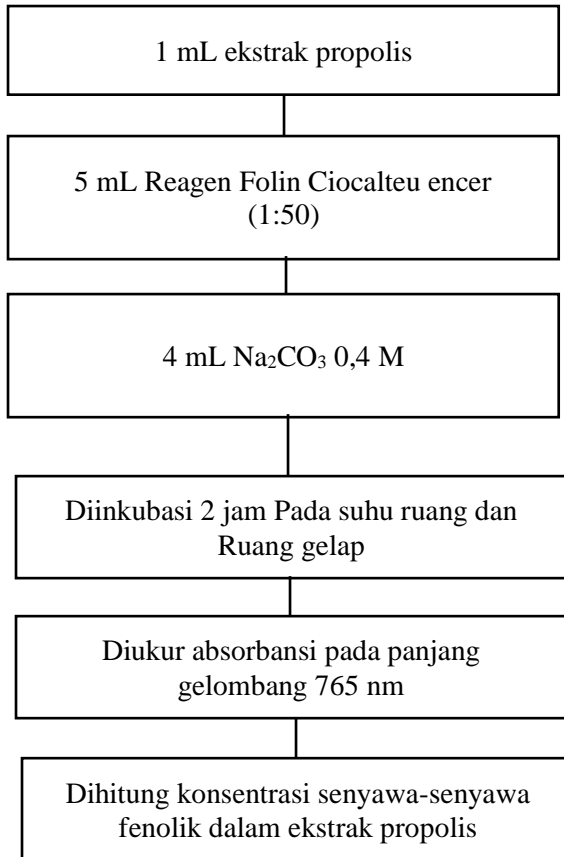
A. Diagram Alir

1. Ekstraksi Propolis

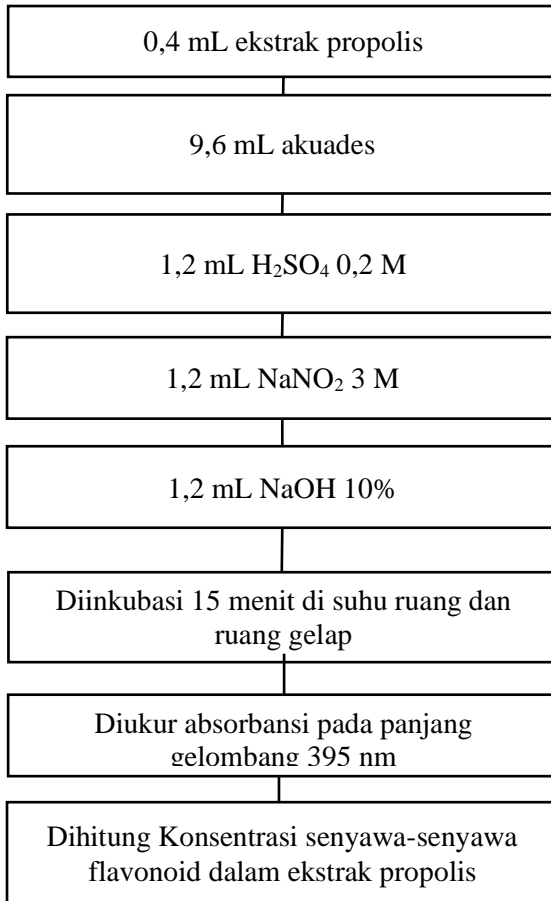


Keterangan: *Metanol, etanol 70%, etil asetat

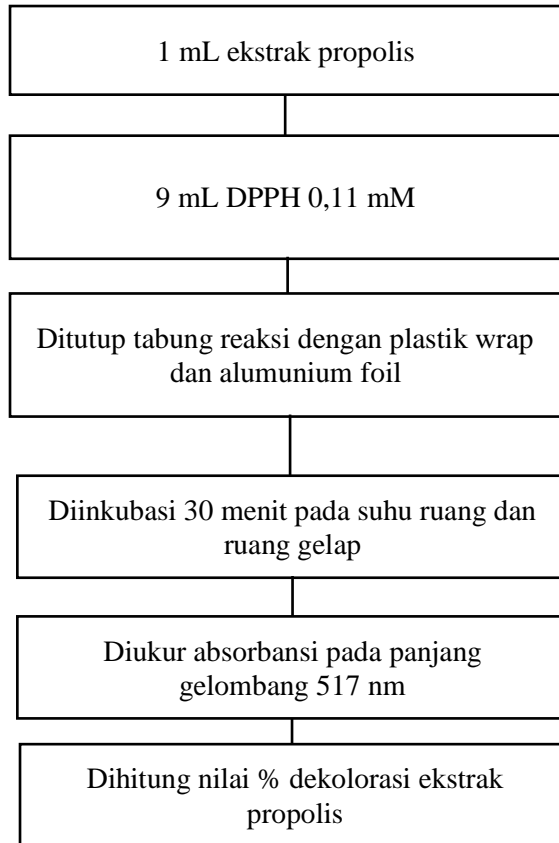
2. Analisa Total Kandungan Fenolik



3. Analisa Total Kandungan Flavonoid



4. Analisa Aktivitas Antioksidan



B. Data dan Perhitungan

1. Ekstraksi Propolis

- Perhitungan (%) Kadar air

Diketahui: Massa Kaca Arloji (MKA) = 27,4087 g

Massa Sarang Lebah Awal (MSL₀) = 1,002 g

Massa Sarang Lebah Akhir (MSL₁) = 0,93 g

$$\begin{aligned}(\%) \text{ Kandungan Air} &= \frac{\text{MSL}_0 - \text{MSL}_1}{\text{MSL}_0} \times 100\% \\&= \frac{1,0020 \text{ g} - 0,93 \text{ g}}{1,0020 \text{ g}} \times 100\% \\&= \frac{0,072 \text{ g}}{1,0020 \text{ g}} \times 100\% \\&= 0,07128 \times 100\% \\&= 7,13 \%\end{aligned}$$

- Hasil Ekstraksi Propolis

| Nama Ekstrak | Warna | V ₀ (mL) | V _t (mL) |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| EpEt | Cokelat muda | 80 | 71,7 |
| EpMe | Cokelat | 80 | 62 |
| EpEa | Cokelat Kekuningan | 80 | 49,5 |

Keterangan: V₀: Volume awal pelarut

V_t: Volume ekstrak setelah maserasi satu minggu

2. Analisa Total Kandungan Fenolik

• Perhitungan Pembuatan Larutan Na_2CO_3 0,4 M

$$\begin{aligned}m &= n \times \text{Mr} \\&= M \times V \times \text{Mr} \\&= 0,4 \times 0,1 \times 105,99 \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \text{L} \times \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \\&= 4,2396 \text{ gram}\end{aligned}$$

*Keterangan: m: massa; Mr: Massa molekul relatif; V: Volume H_2O

a. Pembuatan larutan stok Asam Galat 100 ppm

$$100 \text{ ppm} = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-4} \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 10^{-2} \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$$

Jadi pembuatan larutan stok asam galat dilakukan dengan melarutkan 0,01 g asam galat dalam beberapa mL pelarut, lalu diencerkan kembali hingga tanda batas labu ukur 100 mL.

b. Pengenceran larutan stok asam galat 100 ppm menjadi konsentrasi 80,60,40 dan 20 ppm

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 80 \mu\text{g/mL} \\V_1 &= 0,02 \text{ L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 60 \mu\text{g/mL} \\V_1 &= 0,015 \text{ L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 40 \mu\text{g/mL} \\V_1 &= 0,010 \text{ L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 100 \mu\text{g/mL} &= 0,025 \text{ L} \times 20 \mu\text{g/mL} \\V_1 &= 0,005 \text{ L}\end{aligned}$$

*Keterangan: V_1 : Volume larutan stok; V_2 : Volume pelarut; M_1 : Konsentrasi larutan stok; M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

- Kurva Standar dan Total Kandungan Fenolik

| Data Absorbansi Kurva Standar Asam Galat Ekstrak Propolis dalam Pelarut Etanol | | | | |
|---|----------------------|-------|-------|-----------------------------|
| Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata rata |
| | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,000 |
| 20 | 0,184 | 0,203 | 0,185 | 0,191 |
| 40 | 0,354 | 0,393 | 0,359 | 0,369 |
| 60 | 0,566 | 0,598 | 0,573 | 0,579 |
| 80 | 0,747 | 0,769 | 0,745 | 0,754 |
| 100 | 0,873 | 0,916 | 0,896 | 0,895 |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata rata | SD |
|--------------|---------------|-------|-------|----------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPEt | 0,889 | 0,897 | 0,898 | 0,895 | 0,005 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|---------------------|--------|--------|-----------------------|-------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 96,681 | 97,560 | 97,670 | 97,304 | 0,542 |

| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Fenolik (TKF) | | | Rata-Rata | SD | TKF Akhir (µg/g) |
|---------|----|--------|-------------------------------|---------|---------|-----------|-------|------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 1 | 1 | 103,958 | 104,904 | 105,022 | 104,628 | 0,583 | 104,628 ± 0,583 |

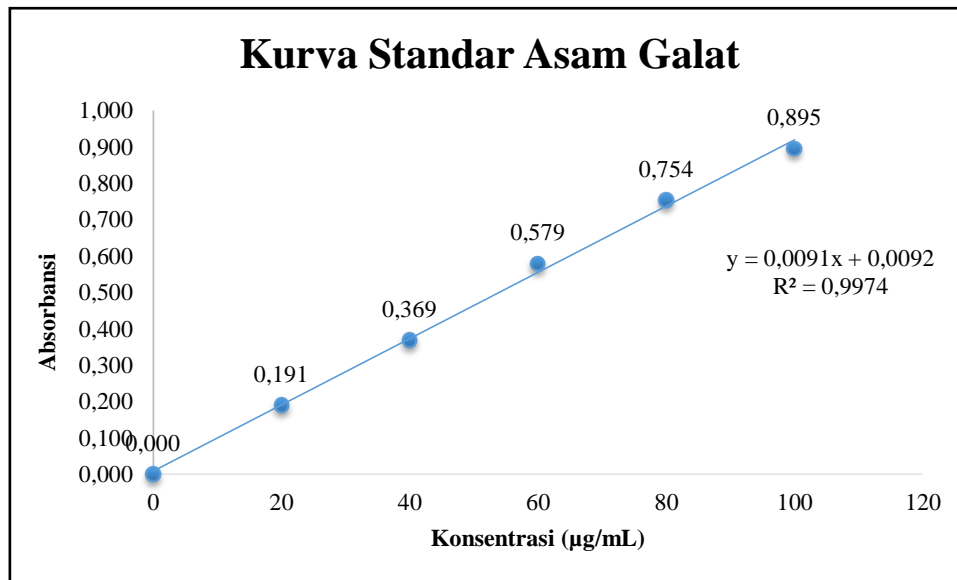
Contoh Perhitungan Total Kandungan Fenolik

$$\text{TKF} = C \times V \times \text{FP} \times \frac{1}{\text{SLK}}$$

$$\begin{aligned}\text{TKF} &= 96,681 \text{ µg/mL} \times 1 \text{ mL} \times 1 \times \frac{1}{0,93 \text{ g}} \\ &= 103,958 \text{ µg/g}\end{aligned}$$

Keterangan: C=Konsentrasi sampel yang didapat dari perhitungan persamaan regresi linier; V= Volume

Ekstrak yang digunakan; FP= Faktor pengenceran; SLK= Sarang Lebah Kering; SD= Standar Deviasi; EPEt= Ekstrak Propolis Etanol; EPMe= Ekstrak Propolis Metanol; EPEa= Ekstrak Propolis Etil asetat.

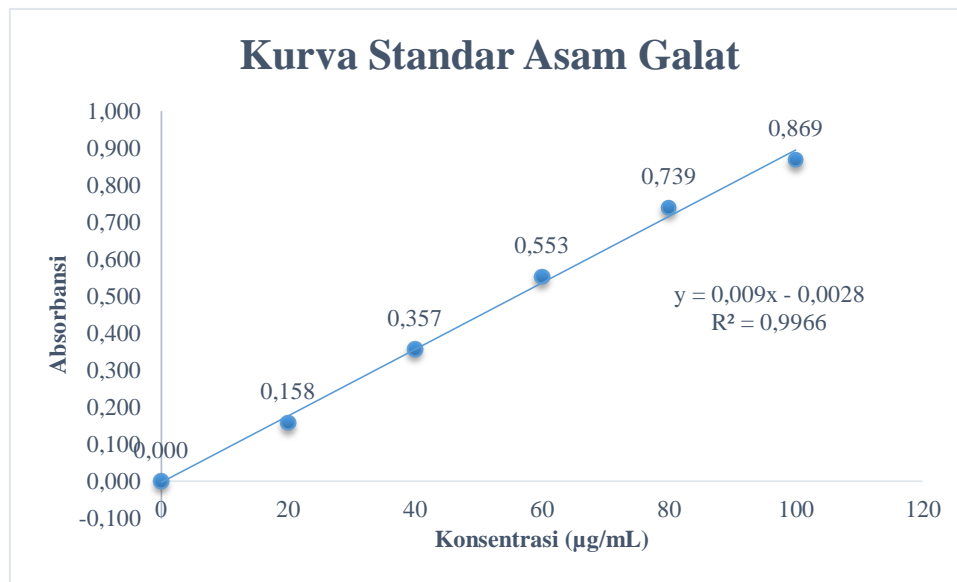


| Data Absorbansi Kurva Standar Asam Galat Ekstrak Propolis dalam Pelarut | | | | |
|---|---------------|-------|-------|----------------------|
| Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata |
| | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,000 |
| 20 | 0,157 | 0,163 | 0,155 | 0,158 |
| 40 | 0,347 | 0,363 | 0,36 | 0,357 |
| 60 | 0,553 | 0,557 | 0,55 | 0,553 |
| 80 | 0,726 | 0,735 | 0,757 | 0,739 |
| 100 | 0,865 | 0,888 | 0,854 | 0,869 |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata | SD |
|--------------|---------------|-------|-------|----------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPMe | 0,204 | 0,205 | 0,209 | 0,206 | 0,003 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|---------------------|--------|--------|-----------------------|-------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 22,978 | 23,089 | 23,533 | 23,200 | 0,294 |

| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Fenolik (TKF) | | | Rata-Rata | SD | TKF Akhir (µg/g) |
|---------|----|--------|-------------------------------|---------|---------|-----------|-------|------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 20 | 1 | 494,146 | 496,535 | 506,093 | 498,925 | 6,321 | 498,925 ± 6,322 |

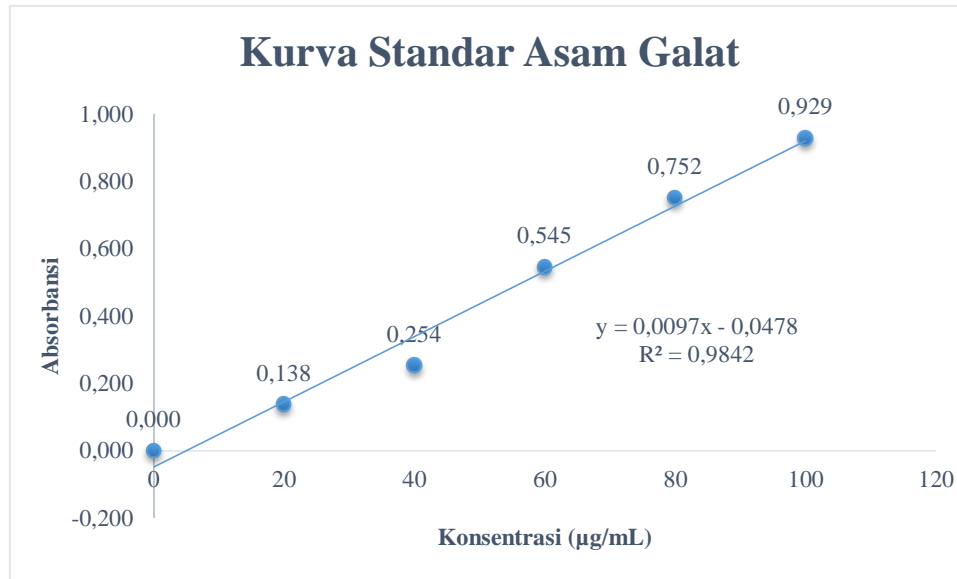


| Data Absorbansi Kurva Standar Asam Galat Ekstrak Propolis dalam Pelarut Etil Asetat | | | | | | | |
|---|--|---------------|-------|-------|----------------------|--|--|
| Konsentrasi (µg/mL) | | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata | | |
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0 | | 0 | 0 | 0 | 0,000 | | |
| 20 | | 0,132 | 0,142 | 0,14 | 0,138 | | |
| 40 | | 0,253 | 0,24 | 0,268 | 0,254 | | |
| 60 | | 0,543 | 0,541 | 0,552 | 0,545 | | |
| 80 | | 0,751 | 0,754 | 0,75 | 0,752 | | |
| 100 | | 0,931 | 0,928 | 0,927 | 0,929 | | |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata | SD |
|--------------|---------------|-------|-------|----------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPEa | 0,225 | 0,198 | 0,193 | 0,205 | 0,017 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|---------------------|--------|--------|-----------------------|-------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 28,124 | 25,340 | 24,825 | 26,096 | 1,775 |

| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Fenolik (TKF) | | | Rata-Rata | SD | TKF Akhir (µg/g) |
|---------|----|--------|-------------------------------|---------|---------|-----------|-------|------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 5 | 1 | 151,203 | 136,238 | 133,466 | 140,302 | 9,541 | 140,302 ± 9,541 |



3. Analisa Total Kandungan Flavonoid

- **Perhitungan Pembuatan Larutan NaNO_2 3 M**

$$\begin{aligned} m &= n \times Mr \\ &= M \times V \times Mr \\ &= 3 \times 0,1 \times 69 \left(\frac{\text{mol}}{L} \times L \times \frac{g}{\text{mol}} \right) \\ &= 20,7 \text{ gram} \end{aligned}$$

*Keterangan: m: massa; Mr: Massa molekul relatif; V: Volume H_2O

Perhitungan Pembuatan H_2SO_4 0,2 M

$$\begin{aligned} M \text{ H}_2\text{SO}_4 &= \frac{n}{v} \\ M &= \frac{mt (g)}{Mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times V (L)} \\ M &= \frac{mt (g)}{mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times v (L)} \\ M &= \frac{mt (g) \times \rho \left(\frac{g}{\text{mL}} \right)}{ml (g) \times mr \left(\frac{g}{\text{mol}} \right) \times v (L)} \\ M &= \frac{98 \times 1,84}{100 \times 98,08 \times 0,1} \left(\frac{gx \frac{g}{\text{mL}}}{g \times \frac{g}{\text{mol}} \times L} \right) \\ M &= 18,38 \text{ M} \end{aligned}$$

Pengenceran H_2SO_4 18,30 M menjadi 0,2 M

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 18,30 \text{ M} &= 0,1 \text{ L} \times 0,2 \text{ M} \\ V_1 &= 1,09 \text{ mL} \end{aligned}$$

* **Keterangan:** %: persentase konsentrasi H_2SO_4 ; M: Molar Konsentrasi H_2SO_4 ; ρ : densitas; Mr: Massa molekul relatif; V_1 : Volume H_2SO_4 18,30 M; V_2 : Volume H_2O ; M_1 : Konsentrasi awal; M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran.

- **Pembuatan Larutan Standar Kuersetin**
- **Pembutan larutan stok 100 µg/mL**

$$100 \frac{\mu g}{mL} = 10^{-4} \frac{g}{mL} = 10^{-2} \frac{g}{100 mL}$$

Jadi pembuatan larutan stok kuersetin dilakukan dengan melarutkan 0,01 g kuersetin dalam beberapa mL pelarut, lalu diencerkan kembali hingga tanda batas labu ukur 100 mL.

- **Pengenceran larutan stok kuersetin 100 ppm menjadi konsentrasi 80,60,40 dan 20 ppm**

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 \times 100 \mu g/mL &= 0,025 L \times 80 \mu g/mL \\ V_1 &= 0,02 L \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu g/mL &= 0,025 L \times 60 \mu g/mL \\ V_1 &= 0,015 L \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu g/mL &= 0,025 L \times 40 \mu g/mL \\ V_1 &= 0,010 L \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 100 \mu g/mL &= 0,025 L \times 20 \mu g/mL \\ V_1 &= 0,005 L \end{aligned}$$

*Keterangan: V_1 : Volume larutan stok; V_2 : Volume pelarut; M_1 : Konsentrasi larutan stok; M_2 : Konsentrasi setelah pengenceran

- **Kurva Standar dan Total Kandungan Flavonoid**

| Data Absorbansi Kurva Standar Kuersetin Ekstrak Propolis dalam Pelarut Etanol 70% | | | | |
|--|----------------------|----------|----------|-----------------------------|
| Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata |
| | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,000 |
| 20 | 0,859 | 0,856 | 0,857 | 0,696 |
| 40 | 1,694 | 1,695 | 1,7 | 1,354 |
| 60 | 2,001 | 2,004 | 2,039 | 2,015 |
| 80 | 2,543 | 2,551 | 2,61 | 2,568 |
| 100 | 2,889 | 2,887 | 2,885 | 3,067 |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata rata | SD |
|---------------------|----------------------|----------|----------|-----------------------------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPEt | 0,106 | 0,097 | 0,103 | 0,102 | 0,005 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|----------------------------|----------|----------|------------------------------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 1,071 | 0,780 | 0,974 | 0,942 | 0,148 |

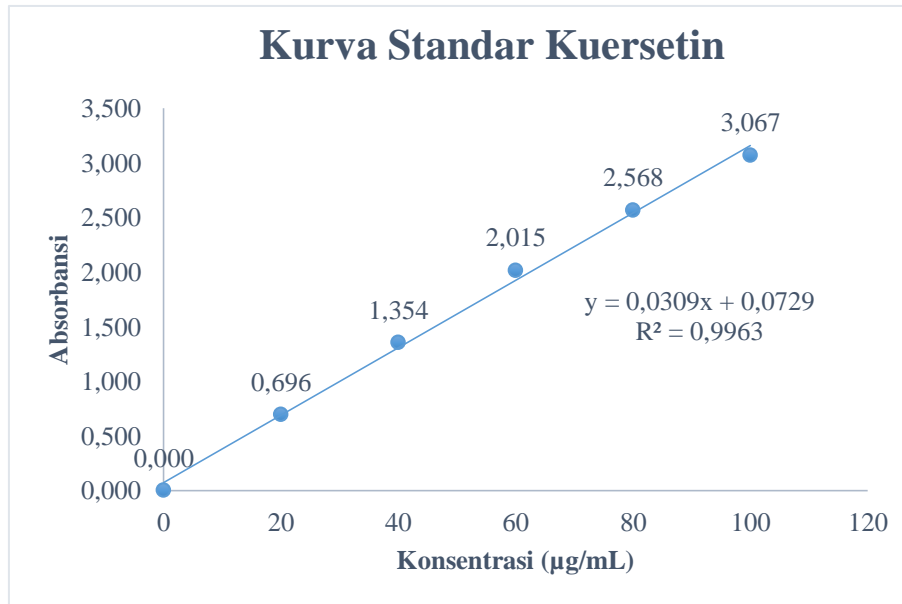
| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Flavonoid (TKFL) | | | Rata-Rata | SD | TKFL Akhir (µg/g) |
|---------|----|--------|----------------------------------|-------|-------|-----------|-------|-------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 1 | 0,4 | 0,461 | 0,335 | 0,419 | 0,405 | 0,064 | 0,405 ± 0,064 |

Contoh Perhitungan Total Kandungan Flavonoid

$$\text{TKFL} = C \times V \times \text{FP} \times \frac{1}{\text{SLK}}$$

$$\begin{aligned} \text{TKFL} &= 1,071 \mu\text{g/mL} \times 0,4 \text{ mL} \times 1 \times \frac{1}{0,93 \text{ g}} \\ &= 0,461 \mu\text{g/g} \end{aligned}$$

Keterangan: C= Konsentrasi sampel yang didapat dari perhitungan persamaan regresi linier; V= Volume Ekstrak yang digunakan; FP= Faktor pengenceran; SLK= Sarang Lebah Kering; SD= Standar Deviasi; EPEt= Ekstrak Propolis Etanol; EPMe= Ekstrak Propolis Metanol; EPEa= Ekstrak Propolis Etil asetat.

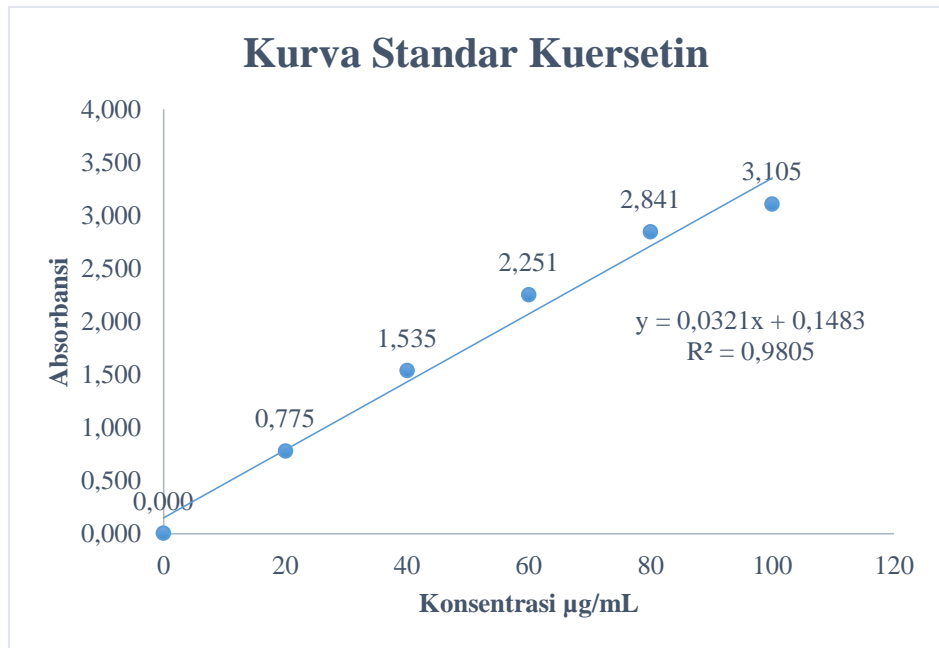


| Data Absorbansi Kurva Standar Kuersetin Ekstrak Propolis dalam Pelarut Metanol | | | | |
|---|----------------------|----------|----------|-----------------------------|
| Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata rata |
| | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,000 |
| 20 | 0,774 | 0,775 | 0,776 | 0,775 |
| 40 | 1,536 | 1,534 | 1,535 | 1,535 |
| 60 | 2,251 | 2,249 | 2,252 | 2,251 |
| 80 | 2,836 | 2,843 | 2,843 | 2,841 |
| 100 | 3,111 | 3,093 | 3,112 | 3,105 |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata | SD |
|---------------------|----------------------|----------|----------|-----------------------------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPMe | 0,626 | 0,640 | 0,626 | 0,631 | 0,008 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|----------------------------|----------|----------|------------------------------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 14,882 | 15,318 | 14,882 | 15,027 | 0,252 |

| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Flavonoid (TKFL) | | | Rata-Rata | SD | TKF Akhir (µg/g) |
|----------------|-----------|---------------|---|----------|----------|------------------|-----------|-------------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 20 | 0,4 | 128,014 | 131,766 | 128,014 | 129,265 | 2,166 | 129,265 ± 2,166 |

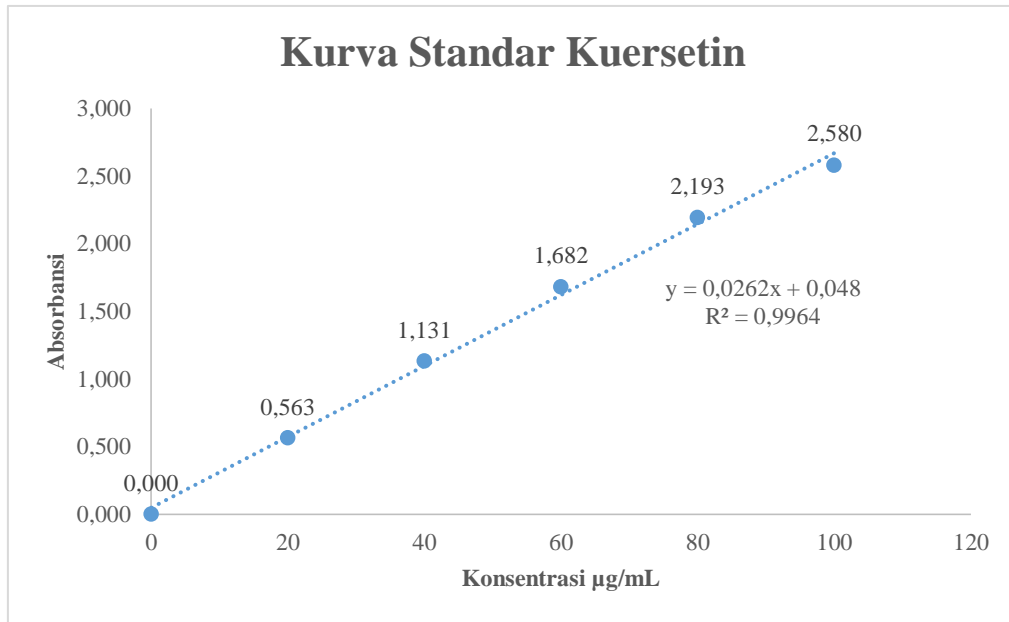


| Data Absorbansi Kurva Standar Kuersetin Ekstrak Propolis dalam Pelarut Etil Asetat | | | | |
|---|----------------------|-------|-------|-----------------------------|
| Konsentrasi (µg/mL) | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata-rata |
| | 1 | 2 | 3 | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,000 |
| 20 | 0,559 | 0,562 | 0,567 | 0,563 |
| 40 | 1,133 | 1,13 | 1,131 | 1,131 |
| 60 | 1,683 | 1,684 | 1,679 | 1,682 |
| 80 | 2,193 | 2,192 | 2,195 | 2,193 |
| 100 | 2,586 | 2,575 | 2,58 | 2,580 |

| Konsentrasi (µg/mL) | | | Konsentrasi rata-rata | SD |
|---------------------|--------|--------|-----------------------|-------|
| 1 | 2 | 3 | | |
| 27,061 | 27,710 | 29,542 | 28,104 | 1,287 |

| Nama Ekstrak | Absorbansi Ke | | | Absorbansi rata rata | SD |
|--------------|---------------|-------|-------|----------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| EPEa | 0,757 | 0,774 | 0,822 | 0,784 | 0,034 |

| SLK (g) | FP | V (mL) | Total Kandungan Flavonoid (TKFL) | | | Rata-Rata | SD | TKF Akhir (µg/g) |
|---------|----|--------|----------------------------------|--------|--------|-----------|-------|------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,93 | 1 | 0,4 | 11,639 | 11,918 | 12,706 | 12,088 | 0,553 | 12,088 ± 0,553 |



1. Uji Aktivitas Antioksidan

- Pembuatan larutan DPPH 0,11 mM

$$0,11 \text{ mM} = 0,11 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$m = n \times Mr$$

$$m = M \times V \times Mr$$

$$m = 0,11 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} \times 394,3 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = 0,00434 \text{ gram}$$

- Data Uji Aktivitas Antioksidan**

| Nama Ekstrak | Absorbansi |
|--------------------|------------|
| DPPPH + Etanol | 1,035 |
| EpEt (1) | 0,117 |
| EpEt (2) | 0,117 |
| EpEt (3) | 0,115 |
| DPPH + Metanol | 0,67 |
| EpMe (1) | 0,062 |
| EpMe (2) | 0,058 |
| EpMe (3) | 0,067 |
| DPPH + Etil Asetat | 0,781 |
| EpEa (1) | 0,081 |
| EpEa (2) | 0,071 |
| EpEa (3) | 0,074 |

- **Perhitungan % Dekolorasi**

| Nama Ekstrak | | Absorbansi Kontrol | | Absorbansi Sampel | | | Absorbansi Rata-Rata | | SD | | |
|--------------|--|--------------------|--|-------------------|-------|------------------------|----------------------|--------------|-------|----------------|--|
| EPEt | | 1,035 | | 0,117 | 0,117 | 0,115 | 0,116 | | 0,001 | | |
| % dekolorasi | | | | SD | | % dekolorasi rata-rata | | % dekolorasi | | | |
| 90,746 | | 91,343 | | 90,000 | | 0,673 | | 90,697 | | 90,697 ± 0,673 | |
| Nama Ekstrak | | Absorbansi Kontrol | | Absorbansi Sampel | | | Absorbansi Rata-Rata | | SD | | |
| EPEA | | 0,781 | | 0,081 | 0,071 | 0,074 | 0,075 | | 0,005 | | |
| % dekolorasi | | | | SD | | % dekolorasi rata-rata | | % dekolorasi | | | |
| 89,629 | | 90,909 | | 90,525 | | 0,657 | | 90,354 | | 90,354 ± 0,657 | |
| Nama Ekstrak | | Absorbansi Kontrol | | Absorbansi Sampel | | | Absorbansi Rata-Rata | | SD | | |
| EPMe | | 0,670 | | 0,062 | 0,058 | 0,067 | 0,062 | | 0,005 | | |
| % dekolorasi | | | | SD | | % dekolorasi rata-rata | | % dekolorasi | | | |
| 88,696 | | 88,696 | | 88,889 | | 0,112 | | 88,760 | | 88,782 ± 0,098 | |

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS



Penulis bernama Rhiby Ainur Basit Hariyanto. Penulis yang dilahirkan di Pamekasan, 10 Juli 1994 ini, merupakan anak pertama dari dua bersaudara pasangan Agus Hariyanto (Alm) dan Siti Nurhayati. Penulis telah menempuh pendidikan formalnya di TK Al-Munawwarah Pamekasan (1998-2000), SDI Al-Munawwarah (2000-2006), SMP Negeri 2 Pamekasan (2006-2009) dan SMA Negeri 1 Pamekasan (2009-2012). Penulis melanjutkan jenjang pendidikan S1 di Jurusan Kimia FMIPA ITS melalui jalur SBMPTN dan terdaftar dengan Nomor Registrasi Pokok (NRP) 1412100088. Pada tahun kedua penulis aktif menjadi staf Dalam Negeri (DAGRI) Forum Komunikasi Mahasiswa Pamekasan (FORKAMP) ITS. Pada tahun kedua dan ketiga penulis juga aktif mengikuti kepanitiaan dari berbagai acara yang diselenggarakan di lingkungan Jurusan, Fakultas dan Forum Daerah Pamekasan, seperti Chemistry Week, FMIPA in Art, Try Out Forkamp dan Madura Robot Contest (MAROCO). Penulis pernah menjalani kerja praktik di Laboratorium Forensik Kepolisian Republik Indonesia Cabang Surabaya. Selama kerja praktik, penulis ditempatkan pada bidang Balistik Metalurgi. Penulis menyelesaikan program Sarjana dengan mengambil tugas akhir di bidang Geokimia Organik Molekular dibawah bimbingan Drs. Agus Wahyudi, M.S., dan Zjhra Vianita Nugraheni, M.Si. Penulis dapat dihubungi melalui email: erib_rainb@yahoo.com.